



UNIVERSITÀ DI PISA

**Facoltà di Medicina Veterinaria  
XXIII ciclo di Dottorato di ricerca in  
“ Produzioni animali sanità ed igiene degli alimenti  
nei Paesi a clima mediterraneo ”**

**TESI DI DOTTORATO**

**“La tracciabilità di razza della carne ovina con metodologie  
di genetica molecolare”**

*Settore Scientifico Disciplinare AGR/17*

**Dottorando: D.ssa Assunta Bramante**

*Bramante Assunta*

**I° Tutor: D.ssa Roberta Ciampolini**

*Roberta Ciampolini*

**II° Tutor: Prof. Ahmad Oulmouden**

**Presidente del Dottorato  
Prof. Domenico Cerri**

*Domenico Cerri*

**Anno 2010**

**Programma di Dottorato di Ricerca in “Produzione Animale, Sanità ed Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima Mediterraneo”**

**Borsa di Dottorato “Fondo Giovani” Bandita dal Ministero dell’ Istruzione dell’ Università e della Ricerca per il Sostegno dei Giovani**

**Vincitrice della Borsa per il Triennio 2008/2010 Dottorassa Assunta Bramante**

**Le Attività di Ricerca della Tesi di Dottorato della Dottorassa Assunta Bramante sono state finanziate nel contesto del progetto Speciale dal Titolo “La tracciabilità di razza della Carne ovina con metodologie di Genetica Molecolare. Finanziato dal Ministero Italiano per le Politiche Agricole Alimentari e Forestali MIPAF per il triennio 2008/2010 Acronimo Progetto di Ricerca TR.OVI.GEN**

**Razionale del Progetto di Ricerca TR.OVI.GEN**

**Il Progetto di Ricerca ha contribuito con i suoi risultati alla protezione della carne ovina italiana di pregio attraverso un sistema di certificazione e di controllo dei processi e dei prodotti mediante metodologie genomiche e di proteomica per la tracciabilità di razza, in grado di garantire la provenienza delle carni o per lo meno in grado di individuare: a) alleli, genotipi, aplotipi, b) proteine e loro isoforme esclusivi o privati di un dato tipo genetico.**

**Il Progetto di Ricerca ha costituito per gli ovini, un modello genomico di riferimento per garantire l'appartenenza delle carni commercializzate alle razze dichiarate e prevenire possibili frodi commerciali. Sono stati impiegati campioni delle principali razze, nazionali o estere, utilizzate per la produzione di carne sul mercato italiano. Il sistema di tracciabilità della carne ovina si è basato sulla tipizzazione di marcatori genetici in tessuti o tagli di carne prelevati ai diversi livelli della filiera produttiva e distributiva.**

**Il Progetto di Ricerca ha inteso approfondire la metodologia genomica per favorire il trasferimento operativo del know-how necessario all'identificazione ed al controllo dell'origine di razza delle carni, attraverso l'ottimizzazione dei set di marcatori molecolari e la costituzione di un archivio di dati molecolari.**

**Il Progetto di Ricerca ha inoltre integrato informazioni provenienti dall' analisi ‘genomica con quelle ottenute dalla proteomica’.**

**Proponente e coordinatore**

**Prof. Dario Cianci Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università di Bari**

#### **4. Partners**

**1. Dipartimento di Produzioni Animali, Università di Pisa**

**- Sezione di Genetica Molecolare Responsabile: D.ssa Roberta Ciampolini**

**- Sezione di Genetica Quantitativa Responsabile: D.ssa Francesca Cecchi**

**2. Dipartimento di Scienze delle Produzioni, dell'Ingegneria, della Meccanica e dell'Economia, Università di Foggia Responsabile: Prof Antonio Muscio**

**3. ConSDABI - National Focal Point italiano della FAO (NFPI - FAO), Benevento Responsabile: Prof Donato Matassino**

**4. Dipartimento di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente, Università del Molise Responsabile: Prof Fabio Pilla**

<b>1</b>	<b>Presentazione.....</b>	<b>5</b>
	<b>Introduzione .....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>La tracciabilità .....</b>	<b>9</b>
	2.1 <i>Definizioni</i>	9
	2.2 <i>Legislazione vigente</i>	10
<b>3</b>	<b>Tracciabilità delle carni.....</b>	<b>11</b>
	3.1 <i>Contesto legislativo</i>	11
<b>4</b>	<b>Sistemi di tracciabilità .....</b>	<b>14</b>
	4.1 <i>Tracciabilità elettronica</i>	14
	4.2 <i>Tracciabilità genetica</i>	14
<b>5</b>	<b>Tracciabilità razziale .....</b>	<b>15</b>
	5.1 <i>Marchi di qualità</i>	16
	5.1.1 DOP - Denominazione di Origine Protetta	16
	5.1.2 IGP - Indicazione Geografica Protetta	17
	5.1.3 Il disciplinare di produzione	17
	5.2 <i>Prodotti ovini DOP e IGP</i>	18
	5.2.1 Formaggio Pecorino Romano DOP	18
	5.2.2 Formaggio Pecorino Sardo DOP	18
	5.2.3 Formaggio Pecorino Siciliano DOP	19
	5.2.4 Formaggio Pecorino Toscano DOP	19
	5.2.5 Formaggio Fiore Sardo DOP	19
	5.2.6 Agnello di Sardegna IGP	20
<b>6</b>	<b>Metodiche di Biologia Molecolare per la Tracciabilità Genetica.....</b>	<b>21</b>
	6.1 <i>Il Progetto Sheep HapMap</i>	22
	6.2 <i>Approccio probabilistico: marcatori microsatelliti</i>	23
	6.3 <i>Approccio deterministico: geni della colorazione del mantello</i>	26
	6.3.1 Il colore del mantello nei mammiferi	27
	6.3.2 Le melanine	27
	6.3.3 Il trasporto dei melanosomi	28

6.3.4	La melanogenesi	28
6.3.5	Classificazione dei mantelli	29
6.3.6	Il colore dei mantelli degli ovini	29
6.3.7	Geni oggetto di studio	31
<b>Materiali e metodi .....</b>		<b>38</b>
<b>7</b>	<b>Razze oggetto di studio .....</b>	<b>38</b>
7.1	<i>Altamurana</i>	38
7.2	<i>Bagnolese</i>	40
7.3	<i>Laticauda</i>	433
7.4	<i>Gentile di Puglia</i>	45
7.5	<i>Leccese</i>	47
7.6	<i>Sarda</i>	50
7.7	<i>Comisana</i>	52
<b>8</b>	<b>Campionamento .....</b>	<b>55</b>
<b>9</b>	<b>Analisi a loci microsatelliti .....</b>	<b>56</b>
9.1	<i>Estrazione del DNA</i>	56
9.1.1	<i>Quantificazione del DNA</i>	56
9.2	La scelta del panel dei marcatori microsatelliti	57
9.2.1	Amplificazione mediante PCR	61
9.2.2	Separazione degli amplificati mediante elettroforesi capillare	621
9.2.3	Analisi degli elettroferogrammi	62
<b>10</b>	<b>La Categorizzazione .....</b>	<b>65</b>
10.1	<i>Fase 1: Stima dei range allelici</i>	65
10.2	<i>Fase 2: Codifica allelica</i>	68
10.3	<i>Fase 3: Calcolo ed applicazione del "fattore di allineamento"</i>	73
10.4	<i>Fase 4: Attribuzione allelica</i>	76



<b>11 Software "TraceDNA" .....</b>	<b>80</b>
11.1 <i>Dettagli del funzionamento del Software TraceDNA v.1.0</i> .....	842
11.2 <i>Ricadute ed applicazioni del software</i> .....	853
<b>12 Analisi statistica sul dato molecolare categorizzato .....</b>	<b>844</b>
12.1 <i>Analisi delle popolazioni</i> .....	844
12.2 <i>Impiego del software Molkin per l'analisi delle relazioni tra le varie razze</i> .....	855
<b>13 Tracciabilità razziale mediante microsatelliti .....</b>	<b>85</b>
13.1 <i>Test di assegnazione di un individuo alla razza</i> .....	85
<b>14 Analisi del polimorfismo ai geni della colorazione del mantello .....</b>	<b>86</b>
14.1 <i>Design dei primers e amplificazione mediante PCR</i> .....	86
14.2 <i>Sequenziamento automatico</i> .....	88
14.3 <i>Analisi dati molecolari</i> .....	88
<b>Discussione dei risultati .....</b>	<b>89</b>
<b>15 Analisi del polimorfismo ai loci STR.....</b>	<b>89</b>
15.1 <i>Test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg</i> .....	96
<b>16 Analisi delle popolazioni.....</b>	<b>99</b>
16.1 <i>Analisi della differenziazione genetica</i> .....	99
16.2 <i>Molkin</i> .....	101
16.3 <i>Similarità genetiche</i> .....	104
<b>17 Test di assegnazione razziale .....</b>	<b>105</b>
17.1 <i>Approccio di likelihood e analisi di potenza</i> .....	105
<b>18 Scelta dei marcatori più informativi.....</b>	<b>111</b>
<b>19 Test di attribuzione razziale eseguito con un subset di marcatori .....</b>	<b>113</b>
<b>20 Analisi di polimorfismo ai geni di colorazione del mantello .....</b>	<b>114</b>
<b>Conclusioni .....</b>	<b>117</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>1211</b>
<b>Documenti allegati.....</b>	<b>12141</b>

## **1 Presentazione**

L'ovinicoltura gioca un ruolo di estrema importanza sul territorio nazionale, soprattutto per le aree interne ed insulari svantaggiate e marginali, con importanti ripercussioni dal punto di vista sociale, economico ed ambientale. La consistenza degli ovini in Italia si posiziona, infatti, al terzo posto dopo quella avicola e suinicola. La garanzia di sicurezza e qualità del prodotto alimentare di origine animale è un problema estremamente sentito dai produttori, trasformati, distributori e soprattutto dai consumatori: a seguito degli allarmanti episodi di contaminazione delle derrate alimentari e delle ripetute zoonosi, infatti, la preoccupazione dei consumatori circa la sicurezza e la richiesta di informazione, riguardo i prodotti carnei, è andata grandemente crescendo.

Di conseguenza, la tracciabilità, anche di razza, della carne è divenuta di estrema importanza, sia per il mercato interno che per quello internazionale, al fine di assicurare la sicurezza alimentare e la veridicità delle informazioni. Nonostante alcuni accorgimenti, il sistema attualmente applicato è esposto a rischi, per la possibilità di interferire sulla filiera con deviazioni dolose o colpose, non sempre facilmente evidenziabili. Si è reso necessario dunque, un sistema di tracciabilità del prodotto, in grado di rendere più sicure e trasparenti le fasi relative alla produzione, trasformazione e vendita delle carni, attraverso la concreta possibilità di un controllo capillare in qualsiasi fase della filiera alimentare che funge da deterrente per eventuali frodi, assicurando il consumatore nel caso di crisi alimentari fornendo informazioni chiare, che possano contribuire ad aumentare la fiducia nel mercato. A tale riguardo la possibilità di utilizzare metodologie molecolari costituisce un supporto rilevante, a sostegno di una corretta verifica delle caratteristiche degli alimenti e di comunicazione con il consumatore.

Dal momento che il DNA rappresenta una vera e propria etichetta indelebile ed inalterabile che accompagna l'animale dalla nascita alle tavole del consumatore, un sistema di tracciabilità genetica permette di risalire dalla carne in qualunque stadio della catena produttiva e distributiva, all'identità dell'animale che l'ha prodotta e/o alla sua razza d'origine.

La tracciabilità individuale è già implementata e pronta ad essere ampiamente utilizzata sul mercato, mentre per la possibilità di garantire la razza d'origine di un determinato taglio di carne sono stati fatti grandi passi avanti ed è tuttora oggetto di ricerca.

Questo lavoro di tesi intende perciò contribuire alla protezione della carne ovina italiana attraverso un sistema di certificazione e di controllo dei processi e dei prodotti mediante metodologie genomiche per la tracciabilità di razza, in grado di garantire la provenienza delle carni o per lo meno in grado di individuare alleli, genotipi e aplotipi esclusivi o privati di un dato tipo genetico.

La ricerca si propone, quindi, di realizzare per gli ovini, come è già stato fatto per i bovini, un modello genomico di riferimento per garantire l'appartenenza delle carni commercializzate alle razze dichiarate e prevenire possibili frodi commerciali.

Nella specie ovina, infatti, la tracciabilità genomica individuale, applicabile ed applicata per le carni bovine, presenta alcuni limiti sostanziali di natura economico-organizzativa, legati soprattutto all'incidenza economica, per unità di prodotto, dei costi di implementazione di un sistema integrato di gestione, per la raccolta capillare e l'archiviazione dei campioni di riferimento, prelevati sugli animali in vita, con i quali poter confrontare, a posteriori, i campioni di verifica, prelevati in una fase qualunque, a valle della filiera produttiva; alla difficoltà di implementare, a livello transnazionale, un tale sistema di raccolta di archiviazione dei campioni di riferimento, per la tracciabilità dei capi e delle carcasse di provenienza estera.

Per lo scopo del presente lavoro, sono stati impiegati campioni delle principali razze nazionali e capi di importazione di provenienza estera, utilizzate per la produzione di carne sul mercato italiano ed è stato realizzato un sistema di tracciabilità della carne ovina, basato sulla tipizzazione di marcatori genetici in tessuti o tagli di carne, prelevati nei diversi livelli della filiera produttiva e distributiva.

Lo studio ha inteso approfondire la metodologia genomica per favorire il trasferimento operativo del know-how necessario all'identificazione ed al controllo dell'origine di razza delle carni, attraverso l'ottimizzazione dei set di marcatori molecolari e la costituzione di un archivio di dati molecolari.

Per la realizzazione di questa metodologia di genetica molecolare in grado di realizzare la tracciabilità razziale delle carni, si considerano due diversi approcci: l'approccio probabilistico e l'approccio deterministico.

Il primo Approccio di studio si basa sull'impiego di marcatori genomici microsatelliti che permettono la costituzione di un genotipo multilocus individuale costituito dal profilo allelico di ogni marcatore. Sulla base della stima delle frequenze alleliche all'interno di ogni razza presa in esame, il metodo stima la probabilità che ogni soggetto appartenga ad

una razza piuttosto che ad un'altra. Si tratta quindi di una metodica inferenziale supportata dal calcolo dei limiti di confidenza e dei valori di potenza del test. La tesi approfondisce particolarmente questo approccio perchè ad oggi maggiormente implementabile in una logica di mercato.

Più recentemente, notevole interesse si sta rivolgendo nei confronti dei marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphisms), che per le loro caratteristiche di elevata abbondanza nel genoma e, soprattutto, di facile e rapida automatizzazione nell'analisi (Syvänen 2001; Vignal et al., 2002), stanno rapidamente prendendo piede negli studi di caratterizzazione genetica di popolazione. I marcatori SNP presentano, tuttavia, rispetto ai marcatori Microsatelliti STR, lo svantaggio di essere bi-allelici e quindi meno informativi; questo inconveniente può essere superato aumentando il numero dei marcatori SNP (Blott et al., 1999), ed attraverso la costituzione di Aplotipi, tra cui selezionare quelli più informativi per gli scopi di Tracciabilità Individuale

Pochi studi si sono occupati di confrontare la potenza statistica di assegnazione genetica di un individuo ad una popolazione mediante SNP piuttosto che mediante marcatori STR e inoltre con un numero modesto di loci. Quest'ultimo aspetto è particolarmente importante perché, se è vero che le relazioni genetiche possono essere efficacemente delineate con un numero modesto di loci SNP la potenza di assegnazione genetica può, invece, essere influenzata dal numero di alleli indipendenti. Quindi, quando si confrontano tra loro classi di marcatori differenti, come nel caso dei marcatori biallelici e multiallelici o, quando si dispone di un panel ampio di SNP, la potenza di assegnazione genetica varia al variare del livello di indipendenza degli alleli ai diversi loci (STR o SNP).

Il test di assegnazione razziale è stato condotto, per entrambe le tipologie di marcatori (STR ed SNP), adottando un approccio di likelihood. Per ciascun soggetto, sono stati calcolati i valori di verosimiglianza (likelihood) di appartenere alla popolazione di origine e questi ultimi sono stati confrontati con i valori di likelihood di appartenere ad ognuna delle altre popolazioni presenti nel dataset. Tali valori di verosimiglianza sono stati calcolati a partire dai valori di frequenza allelica stimati per ciascuna delle popolazioni presenti nel dataset.

Il secondo approccio di studio considera l'analisi dei geni che sottintendono alla colorazione dei mantelli delle varie popolazioni. L'individuazione di mutazioni specifiche di razza, ad esempio in geni che coinvolgono caratteri che si esprimono in modo diverso all'interno delle diverse popolazioni analizzate, permetterebbe di ottimizzare un test rapido e sicuro al fine di discriminare individui appartenenti ad una popolazione piuttosto che ad un'altra. Il punto di partenza per questa metodica di tracciabilità razziale si riferisce

all'effetto della selezione su queste razze di elevata importanza economica, da secoli sottoposte al controllo degli incroci. La selezione genetica, tesa ad aumentare la qualità e la produttività di questi animali, ha riguardato molti caratteri fenotipici, tra cui anche il colore del mantello, come indice di un'evidenza di uniformità di razza. I geni coinvolti nel determinismo di questo carattere appaiono quindi come buoni candidati nella ricerca di polimorfismi specifici di razza.

Questa tesi pone la sua attenzione principalmente sul primo tipo di approccio in quanto consente già in questa fase di rispondere alle esigenze, sempre più pressanti, di un mercato carneo che necessita di essere sostenuto da nuovi strumenti in grado di garantire e certificare qualità e salubrità del prodotto. Il secondo approccio, pur avendo la caratteristica di essere libero da inferenza statistica è legato ad una intensa ricerca di base sui meccanismi che stanno alla base della colorazione del mantello ovino. Da molti anni sono in corso studi in questa direzione: le analisi svolte in questa tesi rappresentano un contributo alla conoscenza del polimorfismo genetico responsabile della diversa colorazione delle razze analizzate.

Gli animali studiati appartengono alle maggiori razze ovine autoctone dell'Italia meridionale continentale: Altamurana, Bagnolese, Gentile di Puglia, Laticauda, Leccese, Sarda e Comisana. I risultati permettono di caratterizzare geneticamente queste razze e forniscono un metodo, basato sull'analisi dei marcatori microsatelliti, direttamente utilizzabile ai fini di garantire la tracciabilità razziale dei prodotti carnei commercializzati sotto garanzia di qualità. Il test messo a punto è stato ottimizzato tenendo conto delle esigenze di economicità e rapidità richieste da una possibile implementazione su larga scala nel mercato: in particolare, è stata posta attenzione alla riduzione del numero di marcatori da tipizzare con metodiche di biologia molecolare, mantenendo alti livelli di sensibilità e accuratezza del test finale. Ulteriori sviluppi potranno proseguire nello studio delle basi genetiche della colorazione del mantello delle razze, al fine di elaborare un nuovo test in grado di integrarsi all'utilizzo dei microsatelliti.

# INTRODUZIONE

## 2 La tracciabilità

### 2.1 Definizioni

Secondo il *Reg. CE n° 178 / 2002 del 28.01.02, art. 3* la tracciabilità può essere definita, come la possibilità di ricostruire e seguire il percorso di un alimento, di un mangime, di un animale destinato alla produzione animale o di una sostanza destinata o atta ad entrare a far parte di un alimento o di un mangime attraverso tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione.

Importante distinzione di significato è quella fra tracciabilità di prodotto e tracciabilità di filiera: la prima è limitata al ciclo di realizzazione di un determinato prodotto e generalmente è confinata ad un solo luogo di lavoro, od anche ad una sola azienda, e ha profonde sinergie con i sistemi di controllo della produzione e di gestione della qualità; la tracciabilità di filiera è invece la capacità di ricostruire la storia e di seguire l'utilizzo di un prodotto mediante indicazioni documentate, relativamente ai flussi materiali ed agli operatori di filiera, dove occorre considerare sia la tracciabilità interna ad ogni organizzazione sia la tracciabilità fra le varie organizzazioni.

La tracciabilità è quindi, obbligatoria in più di un settore applicativo. Nel settore alimentare il principale obbiettivo è quello di assicurare il consumatore nel calo di fiducia verso i produttori ed i distributori in caso di crisi alimentari: la tracciabilità infatti consente di fare chiarezza in tempi brevi sull'attribuzione dell'identità razziale di un prodotto, evitando il rischio di emergenze diffuse o di crollo delle vendite. Inoltre la tracciabilità serve anche a riavvicinare il consumatore al fornitore ed a ridare fiducia al consumatore stesso sulla bontà di ciò che acquista e della serietà e professionalità di chi glielo fornisce. La tracciabilità può costituire anche un vantaggio commerciale: un sistema di tracciabilità certificato secondo le norme UNI/EN/ISO significa infatti, per un'azienda, la possibilità di conseguire il massimo livello di qualità possibile, quindi un plus da esibire alla propria clientela nell'ambito delle certificazioni volontarie secondo standard internazionali. Le norme UNI sulla tracciabilità di filiera agroalimentare (10939) nascono dalle norme di qualità ISO 9001:2000, o Vision 2000, dove la tracciabilità viene giustamente considerata un prerequisito necessario della qualità.

La tracciabilità può, quindi, elevare gli standard operativi e incrementare l'efficienza dei processi per quelle aziende che hanno la competitività fra i propri obiettivi primari. La tracciabilità è uno strumento ottimale per controllare e gestire tutti i processi, dall'origine delle materie prime fino alla distribuzione.

## **2.2 Legislazione vigente**

La legislazione comunitaria nel settore agroalimentare ha come principale obiettivo l'igiene dei prodotti e la sicurezza dei consumatori, e stabilisce dei principi generali consentendo alle aziende di definire in totale autonomia gli aspetti organizzativi, tecnici ed operativi. La norma di riferimento è il regolamento CE 178/2002 ([www.europarl.eu](http://www.europarl.eu)) "Principi e requisiti generali della legislazione alimentare, autorità europea per la sicurezza alimentare e procedure nel campo della sicurezza alimentare" entrato in vigore il 1° gennaio 2005. In questo contesto l'alimento è definito come qualsiasi sostanza o prodotto trasformato, parzialmente trasformato o non trasformato, destinato a essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito da esseri umani.

Di particolare rilievo è anche l'articolo 18 che stabilisce i campi d'azione che verranno investiti dalla nuova norma in materia di tracciabilità:

"È disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime". Come conseguenza, la tracciabilità è divenuta obbligatoria dal 1° gennaio 2005 per tutti i prodotti alimentari; inoltre la definizione indica tutta la filiera, dalla produzione alla distribuzione.

Il Regolamento istituisce l'Autorità alimentare europea e introduce un principio fondamentale, cioè il principio di precauzione. Questo prevede che qualora si verifichino situazioni di incertezza sulla sicurezza del prodotto, si debba considerarlo pericoloso fino a quando non si abbiano evidenze certe che dimostrino il contrario.

Un ulteriore punto fondamentale stabilisce che "Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. A tal fine detti operatori devono disporre di sistemi e di procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, che le richiedano, le informazioni a riguardo. Gli operatori del settore

alimentare e dei mangimi devono disporre di sistemi e procedure per individuare le imprese alle quali hanno fornito i propri prodotti. Le informazioni a riguardo sono messe a disposizione delle autorità competenti che le richiedano. Gli alimenti o i mangimi che sono immessi sul mercato della comunità o che probabilmente lo saranno devono essere adeguatamente etichettati o identificati per agevolarne la rintracciabilità, mediante documentazione o informazioni pertinenti secondo i requisiti previsti in materia da disposizioni più specifiche”. Dunque la tracciabilità ai sensi di questa norma prevede che ciascun attore della filiera tenga memoria e sia responsabile non di tutta la catena, ma soltanto dei due anelli che lo riguardano: uno a ritroso, ossia verso monte, e uno in avanti, ossia verso valle.

### **3 Tracciabilità delle carni**

Per la carne, etichettare il prodotto significa esaltare la sua appartenenza al sistema zootecnico di provenienza e perciò valorizzare non solo un insieme di caratteristiche e qualità organolettiche, ma anche una completa attività di filiera, capace di soddisfare una sempre maggiore e diversificata richiesta di mercato.

#### **3.1 Contesto legislativo**

L’identificazione degli ovini è stata introdotta nella legislazione nazionale con il Regolamento di polizia veterinaria D.P.R. 320/54 ed è andata successivamente affinandosi per rispondere ad esigenze di carattere in un primo momento puramente veterinario, fino ad arrivare all’identificazione e registrazione di tutti i capi bovini e ovini, permettendo l’esecuzione dei piani di profilassi obbligatoria per l’eradicazione della tubercolosi, brucellosi e leucosi.

La Direttiva 90/425/CEE sugli scambi nella comunità di animali e prodotti di origine animale emanata in vista del mercato unico, obbliga all’identificazione e registrazione degli animali per risalire all’azienda di nascita o di passaggio.

Il D.P.R. 317/96, in seguito alla Direttiva 92/102/CEE affida la gestione del sistema di identificazione e registrazione degli animali al Ministero della Salute, dando avvio



all'implementazione dell'anagrafe degli allevamenti di specie bovina, bufalina, ovina, caprina e suina e all'identificazione dei bovini e bufalini.

Il Regolamento (CE) n. 21/2004 del Consiglio, del 17 dicembre 2003, istituisce un sistema di identificazione e di registrazione degli animali delle specie ovina e caprina, che modifica il regolamento (CE) n. 1782/2003 e le direttive 92/102/CEE e 64/432/CEE: esso definisce un sistema di tracciabilità individuale che consente di seguire ciascun animale della specie ovina e caprina dalla nascita e durante gli scambi intracomunitari.

Tutti gli animali della specie ovina e caprina nati nelle aziende comunitarie devono essere identificati da un primo mezzo d'identificazione, che consiste in un marchio auricolare autorizzato dalle autorità competenti nazionali, apposto ad un orecchio, in materiale inalterabile, a prova di manomissione e facilmente leggibile per tutta la durata della vita dell'animale, senza nuocergli. Il marchio deve essere facilmente visibile a distanza e comprendere un codice dello Stato membro dell'azienda nonché un codice individuale; un secondo mezzo di identificazione, che può essere costituito da un marchio auricolare, da un tatuaggio, tranne per gli scambi intracomunitari, un marchio sul pastorale oppure un trasponditore elettronico.

Gli Stati membri possono autorizzare un sistema alternativo per gli animali destinati ad essere abbattuti prima dell'età di dodici mesi e che non sono destinati a scambi intracomunitari: in questo caso, occorre che gli animali portino unicamente un marchio auricolare che presenta il codice del paese e il codice che identifica l'azienda d'origine. L'identificazione deve essere effettuata nei sei mesi che seguono la nascita dell'animale e prima che esso abbandoni la sua azienda d'origine. Gli Stati membri possono estendere tale periodo a nove mesi per gli animali detenuti in condizioni di allevamento estensivo o all'aperto. Per gli animali importati dai paesi terzi, l'identificazione si deve svolgere nell'azienda di destinazione entro un termine massimo di 14 giorni.

Ogni persona responsabile di animali, anche a titolo temporaneo, deve tenere un registro contenente le informazioni enumerate nel presente regolamento. Di conseguenza, quest'ultimo enuncia le informazioni che devono essere contenute nel documento di circolazione che accompagna tutti i gruppi di animali ogniquale volta vengano spostati.

La gestione dei registri e dei documenti di circolazione può variare secondo lo Stato membro: ad esempio, taluni paesi possono esigere informazioni complementari; di conseguenza, questi documenti possono essere resi facoltativi nei paesi dove una base di dati centralizzata elettronica raccoglie le informazioni interessate. Ogni modello di registro e di documento di circolazione utilizzato deve essere comunicato alla Commissione e agli

altri Stati membri. Le autorità competenti nazionali tengono un registro centrale contenente le informazioni relative a tutte le aziende situate sul territorio nazionale. Queste informazioni riguardano la gestione, le persone responsabili degli animali, l'attività, il tipo di produzione e le specie detenute.

Con decorrenza dal 1° gennaio 2008, in ciascuno Stato membro, una base di dati informatici deve obbligatoriamente contenere taluni dati relativi alle aziende e ai movimenti degli animali. I movimenti di animali devono essere notificati dall'allevatore all'autorità competente entro un termine di sette giorni.

Inoltre, a partire dal 1° gennaio 2008, deve essere obbligatoriamente applicato un sistema di identificazione elettronica. Gli Stati membri in cui gli animali delle specie ovina e caprina sono almeno 600 000 possono rendere questi sistemi elettronici facoltativi per gli animali che non sono implicati negli scambi intracomunitari. Al fine di garantire il rispetto del presente regolamento, sono condotti controlli dagli Stati membri inviati sul posto dalla Commissione: vengono anche applicate sanzioni in caso di infrazione al regolamento.

Lo scopo di questi regolamenti è di sviluppare un sistema nell'ambito del quale si forniscono informazioni al consumatore mediante un'etichettatura adeguata e chiara del prodotto e che deve essere necessariamente legata, in fase di produzione, all'identificazione e registrazione degli ovini. Questo soddisfa anche esigenze di carattere generale, quale la tutela della sanità pubblica e animale; permette di ristabilire la fiducia dei consumatori verso la qualità del prodotto e di giungere ad un incremento del consumo delle carni.

Questo sistema, creato per garantire i consumatori sulla qualità della carne che acquistano, presenta però alcuni punti critici: lungo la filiera produttiva e distributiva, infatti, molti punti si prestano alla possibilità di intervenire in maniera colposa o dolosa sulla certificazione dell'identità dell'animale.

Proprio per ovviare a questi inconvenienti, in alcuni paesi europei, Italia compresa, si stanno sperimentando sistemi alternativi come la tracciabilità tramite analisi del DNA. Infatti, già nel Regolamento (CE) n. 21/2004 si fa riferimento al "genotipo" dell'animale, ai sensi dell'articolo 9, paragrafo 3, per ciascun animale nato dopo il 1° gennaio 2008, devono essere riportate le seguenti informazioni aggiornate:

- il codice di identificazione dell'animale,
- l'anno di nascita e la data d'identificazione,
- il mese e l'anno del decesso dell'animale nell'azienda,

- la razza e, se conosciuto, il genotipo.

Sfruttando l'unicità dell'informazione genetica propria di ogni animale è infatti possibile garantire una corrispondenza del 100% tra i tagli di carne e i soggetti dai quali si dichiara essi provengano.

## **4 Sistemi di tracciabilità**

### **4.1 Tracciabilità elettronica**

I sistemi di tracciabilità elettronica hanno lo scopo di fornire un'identificazione mediante un codice elettronico non cancellabile all'interno dei transponder, cioè dei dispositivi elettronici di ridottissime dimensioni, tali da poter essere facilmente alloggiati all'interno di marche auricolari. Questa identificazione viene arricchita di dati anagrafici, di passaggi di proprietà e di dati sanitari, costituendo così il passaporto elettronico che accompagna tutta la vita dell'animale.

La tracciabilità prosegue anche al macello, dove dal microchip di origine, ovvero dell'animale in vita fino alla macellazione, vengono prodotte delle copie, che seguiranno mezzene e quarti fino al banco del dettagliante o al laboratorio di sezionamento. Tali unità operative della filiera, coinvolte nel processo di tracciabilità elettronica, vengono dotate di un sistema di lettura del transponder, sulla base del quale stampare l'etichetta corrispondente: in questo modo, ogni singola vaschetta viene dotata di tutte le informazioni contenute nel microchip di origine. Il sistema, offre un maggior grado di certezza da affiancare alla documentazione cartacea, ma rimane esposto alla possibilità di manipolazioni al momento del sezionamento.

### **4.2 Tracciabilità genetica**

Nei sistemi di identificazione sopracitati, la veridicità delle informazioni fornite dal sistema non può essere verificata in altro modo che controllando la documentazione cartacea e/o elettronica. Nonostante la buona fede e volontà degli operatori, tali flussi informativi possono essere soggetti a modifiche od errori. Pertanto, è di primaria importanza trovare uno strumento che affianchi i sistemi di rintracciabilità esistenti, per permettere agli operatori della filiera, al consumatore ed agli organi di vigilanza di accertare con sicurezza

l'origine della carne, verificando le indicazioni documentali (passaporto, numero di identificazione dell'animale, etichetta della carne). L'analisi del DNA può soddisfare questa necessità, consentendo in ogni step della filiera produttiva e distributiva, di verificare la veridicità dell'informazione documentata (Primmer et al., 2000).

Il vantaggio principale dell'approccio consiste nella non falsificabilità del riconoscimento ottenuto con tecniche di biologia molecolare applicate al DNA genomico. Il genotipo individuale è unico per ciascun animale e non è modificabile; esso può essere controllato indipendentemente, dalla nascita alla tavola del consumatore, fornendo quindi la possibilità di monitorare con specificità prossima al 100% la filiera produttiva a tutti i livelli. È stato infatti dimostrato (Papa et al. 2004) che il DNA estratto non solo da carne fresca, ma anche da matrici sottoposte a vari trattamenti, come carne congelata, frollata, cotta o lavorata, è in grado di fornire un profilo molecolare leggibile, indicando come la frollatura, la cottura e la lavorazione delle carni non pregiudichino la fattibilità di una prova di tracciabilità genetica. Questo tipo di analisi, conserva la sua validità anche in seguito alla normale lavorazione della carne eseguita dal consumatore, quale bollitura, cottura in padella, al microonde, nella produzione di sughi o lavorata con uovo, quindi compresenza di DNA di avicolo o altre specie. La possibilità di effettuare l'analisi a partire da qualunque substrato biologico, contribuisce ad eliminare la possibilità di uno scambio, colposo o doloso, di identità del capo commercializzato. Questa metodica è quindi utilizzabile tanto per la verifica della corretta etichettatura delle carni fresche, quanto per il controllo nelle fasi successive della filiera, presso centri di preparazione pasti o ristorazione collettiva in genere.

Il sistema si basa sul confronto dei picchi allelici di un adeguato numero di marcatori genetici eseguito su due campioni: l'uno estratto dall'animale, l'altro dalla carne. La perfetta sovrapposizione dei profili genetici ricavati dai due o più prelievi, rappresenta la certezza dell'appartenenza allo stesso animale del materiale biologico analizzato.

## **5 Tracciabilità razziale**

Un altro aspetto critico e sempre più attuale nel mercato carneo, riguarda il problema della tracciabilità razziale.

L'adeguamento dell'offerta alla domanda esige che i produttori vengano incontro ai desideri dei consumatori, che chiedono sempre più prodotti sani, nutrienti ed in linea con metodi di produzione che rispettano l'ambiente. Questo orientamento del mercato fa sì che l'interesse del consumatore sia rivolto in maniera sempre più presente, verso il prodotto di

“qualità”. Nell’ottica della globalizzazione del mercato, il prodotto carneo di qualità, per essere difeso e reso competitivo, necessita di essere conosciuto come tale e di essere valorizzato nella sua tipicità, qualità e salubrità. Da qui la necessità di trasparenza per quei prodotti che attestano una determinata origine geografica o l’appartenenza ad una razza allevata con criteri di tipicità o salubrità.

## **5.1 Marchi di qualità**

### *5.1.1 DOP - Denominazione di Origine Protetta*

La DOP nasce, insieme alla IGP, nel 1992 grazie al Regolamento CEE 2081/92 della Comunità Europea, ed è valida per i prodotti agroalimentari, vini e bevande alcoliche esclusi. È il marchio che impone le norme più stringenti in assoluto. La DOP offre garanzie su diversi livelli del processo produttivo: origine, provenienza delle materie prime, localizzazione e tradizionalità del processo produttivo. I prodotti certificati DOP offrono infatti:

- 1) Garanzia, in quanto sono prodotti regolamentati da leggi italiane e comunitarie;
- 2) Tracciabilità, poiché i prodotti provengono da una zona geografica delimitata;
- 3) Legame con il territorio, poiché i prodotti sono ottenuti attraverso metodi tradizionali, presentano peculiari caratteristiche dovute ad un intimo legame tra il prodotto ed un territorio con caratteristiche geologiche, agronomiche e climatiche inimitabili;
- 4) Tipicità ovvero rispetto del metodo di produzione tradizionale e dei metodi di fabbricazione che preservano la tipicità del prodotto.

Per poter ricevere l'appellativo devono sussistere due condizioni irrinunciabili:

- 1) Le particolari qualità e caratteristiche del prodotto devono essere dovute, esclusivamente o essenzialmente, all'ambiente geografico del luogo d'origine. Per "ambiente geografico" la legge intende non solo i fattori naturali ma anche le tecniche di allevamento locali.
- 2) La produzione delle materie prime e la loro trasformazione fino al prodotto finito devono essere effettuate nella regione delimitata di cui il prodotto porta il nome.

La tracciabilità di un prodotto DOP offre la garanzia riguardo il luogo di provenienza e di trasformazione delle materie prime. Ogni prodotto DOP, per diventare tale, deve rispettare un disciplinare di produzione che vincola tutte le fasi della produzione e della trasformazione. Generalmente tutti i prodotti DOP hanno un consorzio di tutela, ovvero un organismo composti da produttori e/o trasformatori aventi come scopo la tutela, la promozione e la valorizzazione dello stesso. Essi hanno anche un ruolo di informazione al consumatore e di vigilanza sulle produzioni. Salvaguardano inoltre il prodotto da abusi, atti di concorrenza sleale, contraffazioni ed uso improprio della denominazione.

#### *5.1.2 IGP - Indicazione Geografica Protetta*

La certificazione IGP prevede norme meno stringenti rispetto alla DOP.

Per potersi fregiare di questo titolo un prodotto deve avere le seguenti caratteristiche.

- 1) Essere originario della regione attestata;
- 2) Possedere una peculiare caratteristica determinata dall'origine geografica;
- 3) La produzione e/o trasformazione e/o elaborazione devono avvenire nell'area geografica determinata.

#### *5.1.3 Il disciplinare di produzione*

Il disciplinare di produzione è l'insieme delle indicazioni e delle prassi operative a cui il produttore deve attenersi per ottenere la certificazione. Queste regole vengono stabilite dai produttori e dagli enti che valutano le domande di certificazione, e rappresentano l'essenza stessa della certificazione poichè definiscono le qualità garantite al consumatore che acquista il prodotto certificato.

### *5.2 Prodotti ovini DOP e IGP*

Le razze italiane oggetto di questa tesi appartengono ad una filiera di qualità e la loro produzione è regolata e tutelata da specifici disciplinari. E' presentata qui di seguito la lista dei prodotti ovini DOP, per la maggior parte di origine casearia e per i quali, tuttavia, il

disciplinare non prevede l'uso esclusivo di singole razze, come invece avviene per il prodotto carneo “Agnello di Sardegna IGP”, per il quale però è anche possibile utilizzare incroci di prima generazione con razze da carne altamente specializzate. Allo stato attuale la tracciabilità razziale dei formaggi prodotti con latte massale plurirazza non è fattibile con l’approccio probabilistico, mentre invece sembra possibile con l’approccio deterministico (Fontanesi et al. 2009a, 2011a) anche per quei prodotti monorazza per cui la tracciabilità individuale non è concepibile. Nuovi metodi si stanno mettendo a punto anche per il rilevamento di DNA specie-specifico in latte e prodotti caseari di bovini, ovini, caprini e bufali (Reale et al. 2008). La tracciabilità razziale si configura come un obiettivo primario soprattutto per quei prodotti per cui è obbligatorio l’impiego di una sola razza, in quanto è proprio questo utilizzo esclusivo che esalta la tipicità del prodotto. Le metodiche di tracciabilità proposte in questa tesi sono fondamentali per la tutela e la valorizzazione di queste produzioni.

#### 5.2.1 Formaggio Pecorino Romano Dop

- Area di produzione: nei territori di Lazio, Sardegna e nella provincia di Grosseto in Toscana
- Tipologia: formaggio con latte fresco di pecora
- Caratteristiche:
  - forma cilindrica di 25-35 cm di diametro per un peso di 20-35 kg
  - pasta con struttura compatta leggermente occhiata, di colore dal bianco al paglierino
  - sapore gradevole, piccante con la stagionatura

#### 5.2.2 Formaggio Pecorino Sardo Dop

- Area di produzione: province di Cagliari, Nuoro, Oristano, Sassari
- Tipologia: formaggio a pasta bianca, compatta, a stagionatura variabile. Due tipologie: Pecorino Sardo Dolce - Pecorino Sardo Stagionato
- Caratteristiche:
  - Forma: cilindrica con diametro 15-18 cm e scalzo di 6-8 cm
  - Peso: 1-2,3 Kg (4 Kg per lo stagionato)

- crosta sottile liscia di colore bianco o paglierino tenue (colore bruno per lo stagionato); pasta bianca morbida, compatta o con rada occhiatura

#### 5.2.3 Formaggio Pecorino Siciliano Dop

- Area di produzione: nei territori della Sicilia
- Tipologia: formaggio a pasta dura di latte di pecora
- Caratteristiche:
  - forma cilindrica di 10-18 cm di altezza per un peso di 4-12 kg; crosta bianco giallognola; pasta compatta bianca paglierina
  - sapore da delicato a piccante con la stagionatura

#### 5.2.4 Formaggio Pecorino Toscano Dop - Regioni Toscana, Umbria e Lazio

- Area di produzione: nei territori della Toscana e in alcune province confinanti di Umbria e Lazio
- Tipologia: formaggio a pasta tenera o semidura, ottenuto da latte ovino intero
- Caratteristiche:
  - forma cilindrica di 7-11 cm di altezza, 15-22 di diametro per un peso di 1-3 kg; crosta paglierino più o meno intenso; pasta tenera
  - sapore fragrante leggermente piccante

#### 5.2.5 Formaggio Fiore Sardo Dop

- Area di produzione: in tutto il territorio sardo
- Tipologia: formaggio a pasta dura ottenuto da latte di pecora
- Caratteristiche:
  - Fiore Sardo: da 1,5 a 4 kg di peso;
  - fresco: pasta compatta friabile e morbida di colore bianchissimo
  - stagionato: meno morbido, più compatto



#### 5.2.6 Agnello di Sardegna IGP

L'agnello di Sardegna IGP si caratterizza per le sue dimensioni più ridotte rispetto agli agnelli prodotti in altre zone d'Italia. Viene prodotto su tutto il territorio isolano. La carne è bianca, tenera; l'odore ed il sapore particolarmente intensi. E' venduto in tre tipologie: "da latte", con peso massimo fino a 7 kg, proveniente da pecore di razza sarda allevate in purezza e alimentato con solo latte materno; "leggero", da 7 a 10 kg, e "da taglio", da 10 a 13 kg. La razza utilizzata è la Sarda, allevata in purezza o mediante incroci di prima generazione con razze da carne altamente specializzate e sperimentate. Gli alimenti utilizzati sono naturali, foraggi e cereali freschi o essiccati. Ha ottenuto l'IGP nel 2001.

La recente acquisizione del marchio europeo IGP fa sì che il numero di allevamenti che hanno sinora aderito al sistema di certificazione sia ancora ridotto rispetto alle potenzialità del territorio. I capi allevati sono attualmente circa 100.000 e gli allevamenti più di 200 ([www.agriturist.it](http://www.agriturist.it)).

In questo contesto il sostenere l'appartenenza di un taglio di carne a questa razza è una evidente affermazione di un prodotto di qualità, protetto da un marchio e gestito da un consorzio. La tracciabilità razziale rappresenta quindi uno strumento di tutela da parte di chi produce e vende sotto un disciplinare ben preciso e di chi acquista una carne di qualità pagandola secondo un valore aggiunto.

Gli obiettivi a cui una tracciabilità razziale può rispondere sono:

- La caratterizzazione del prodotto tipico, insieme alla standardizzazione della sicurezza all'interno della catena produttiva,
- Il rafforzamento delle strategie di mercato che mirano alla qualità del prodotto,
- La tutela e la valorizzazione di sistemi di produzione più sostenibili ed ecocompatibili.

## **6 Metodiche di Biologia Molecolare per la Tracciabilità Genetica**

Il problema di assegnare un individuo ad una popolazione è da molti anni oggetto di studio. Le prime applicazioni per cui si è reso necessario affrontare questo tipo di problema riguardano studi ecologici, filogenetici, di gestione della variabilità genetica di una popolazione (Davies 1999, Bjornstad e Roed 2002, Koskinen 2003). Fin dagli ultimi anni dello scorso secolo, le metodiche di biologia molecolare si sono presentate come utili strumenti per affrontare il problema. In particolare i marcatori anonimi come i microsatelliti, per le loro caratteristiche evolutive sembrano particolarmente indicati ai fini di caratterizzare gli individui di una popolazione (Buchanan et al., 1994; Schmid et al., 1999). I microsatelliti infatti hanno una rapida capacità di mutare, a causa della struttura ripetitiva che li contraddistingue e questo fa sì che presentino una certa variabilità allelica all'interno di una popolazione, che diventa notevolmente più accentuata tra popolazioni diverse (Roques et al., 1999). Le frequenze alleliche possono essere un'indicazione forte di identità di popolazione. Sono stati testati metodi basati su diverse tipologie di marcatori anonimi, marcatori diallelici o allozimi, ma i microsatelliti sono risultati più informativi allo scopo di discriminare popolazioni animali (Blott et al., 1999).

Nelle specie di interesse zootecnico, si stanno mettendo a punto test di tracciabilità genetica individuale basati sui marcatori biallelici (Goffaux et al.; Heaton et al., 2005, Negrini et al. 2007, 2009). Fino ad oggi, nella specie bovina sono stati resi noti 69 SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) altamente informativi (Heaton et al., 2002; Werner et al., 2004) e di recente è stato messo a punto un metodo innovativo per la discriminazione degli SNP basato sulla Real Time PCR testato su diverse razze bovine (Capoferri et al., 2004).

Nella specie ovina, sono disponibili ad oggi solo un numero molto limitato di SNP validati per studi popolazionistici (Pariset et al., 2006), anche se stanno diventando marcatori d'elezione in una vasta gamma di applicazioni in genetica di conservazione. A differenza dei marcatori microsatelliti, sono co-dominanti e presenti in gran numero su tutto il genoma, hanno un tasso di mutazione contenuto e consentono di amplificare anche DNA altamente degradato, permettendo l'individuazione di polimorfismi in frammenti lunghi anche solo poche decine di paia di basi. L'interesse per gli SNP è dato dalla rapidità e dai costi di genotipizzazione mediante tecniche altamente automatizzabili, nonché dalla riproducibilità delle analisi e dalla semplicità di interpretazione dei risultati. Il limite di informatività dovuto alla natura biallelica viene compensato dalla contemporanea genotipizzazione di un numero molto maggiore di SNP. Nonostante i numerosi vantaggi legati all'adozione degli SNP,

dubbi sussistono ancora riguardo alle loro potenzialità per la necessità di disporre di un panel più ampio rispetto ai microsatelliti data la loro minore informatività. E' accettato che per ottenere una informatività paragonabile a quella di un marcatore multiallelico occorrerebbe un numero di SNP variabile tra 2,5 e 6,3.

L'incertezza ancora esistente sulla informatività dei due tipi di marcatori ci ha suggerito di confrontare la loro capacità discriminante ed anche di tentare la combinazione STR/SNP quale approccio potenzialmente più potente per l'analisi della differenziazione genetica tra popolazioni.

Il panel di marcatori SNP è stato scelto mediante analisi in silico, adottando criteri quali informatività ed indipendenza dei loci, a partire dai 1536 SNP ovini identificati dall'International Sheep Genomics Consortium (<http://www.sheephapmap.org/>).

In questa tesi verranno comunque approfondite le analisi condotte sui marcatori microsatelliti STR.

#### *6.1 Il progetto Sheep HapMap*

I progetti di sequenziamento su larga scala hanno consentito la genotipizzazione di 4,4 milioni di SNP nell'uomo, 2,8 milioni nel pollo, 2,5 milioni nel cane, 8,2 milioni nel topo e 60.000 nel bovino. Per quanto riguarda la specie ovina, Kijas et al. (2009), per conto dell'International Sheep Genomic Consortium, hanno pubblicato i risultati preliminari dei livelli di variabilità genetica osservati all'interno e tra un panel di 23 razze appartenenti alla specie ovina domestica e 2 popolazioni della specie ovina selvatica genotipizzate con il primo genome wide set di SNP per *Ovis aries* costituito da 1536 SNP. Nel marzo 2009 l'International Sheep Genomic Consortium in collaborazione con "Illumina" (Illumina Inc., San Diego, CA) ha ultimato, nel contesto del Progetto "Sheep HapMap", la genotipizzazione di un campione costituito da oltre 70 razze ovine provenienti da tutti i continenti con circa 50.000 SNP. Ad oggi sono ancora in corso le elaborazioni dei dati genotipici ottenuti.

Si è quindi ritenuto di grande interesse prendere parte a tale iniziativa, anche per poter disporre di un archivio di informazioni genomiche su un ampio spettro di razze ovine internazionali. Un target di genotipizzazione è stato individuato nelle razze Altamurana, Comisana, Leccese e Sarda. Complessivamente, 92 soggetti, sono stati genotipizzati, nel contesto del progetto Internazionale "Sheep HapMap", con un panel di circa 50.000 SNP. Il progetto ha previsto anche la genotipizzazione, con lo stesso panel di marcatori SNP, di altri

circa 3000 soggetti appartenenti a 74 razze provenienti da tutti i continenti (Africa, Asia, Sud America, Europa, Medio Oriente, Australia, Stati Uniti, Caraibi e Nuova Zelanda).

La genotipizzazione è stata effettuata da “Illumina” utilizzando un 50K “iSelect™ SNP BeadChip”, messo a punto grazie alla collaborazione tra “Illumina” e “International Sheep Genomic Consortium”.

## **6.2 Approccio probabilistico: marcatori microsatelliti**

Sono stati testati più approcci per trattare i dati ottenuti dallo studio dei microsatelliti (Rosenberg et al., 2001; Maudet et al., 2002a; Manel et al., 2004; Bozzi et al. 2009). I primi metodi elaborati si basavano sulle differenze tra le frequenze alleliche della totalità della popolazione, in seguito sostituiti dallo studio dei genotipi multilocus individuali, sulla base dell’assunzione che individui provenienti da una stessa popolazione presentino genotipi simili (Eldridge et al., 2001). Da questa premessa comune si sono sviluppati diversi metodi tra cui uno dei primi elaborato da Bowcock et al., 1994 ed ispirato a studi filogenetici. I dati molecolari vengono utilizzati per costruire un albero filogenetico basato sul calcolo delle distanze, che fornisce una rappresentazione del modo in cui gli individui si ripartiscono in cluster rappresentanti le popolazioni d’origine. Un vantaggio di questo approccio è che consente una misura del grado di somiglianza dell’individuo con la popolazione d’origine, ma risulta strettamente dipendente dal tipo di calcolo di distanze che si adotta e dal tipo di albero che le rappresenta. Questo approccio ha le caratteristiche di un’indagine preliminare piuttosto che di un test di verifica (Pritchard et al., 2000).

I metodi più recenti di assegnazione di un individuo alla popolazione di riferimento si basano sul concetto di verosimiglianza, vale a dire una stima della probabilità che un genotipo multilocus individuale possa essere riscontrato in una popolazione rispetto ad un’altra. Il calcolo della verosimiglianza (likelihood) si basa sull’assunzione dell’equilibrio di Hardy Weinberg per tutti i loci per tutte le popolazioni analizzate e sul linkage equilibrium. Questi due presupposti implicano che i loci segreghino indipendentemente e non ci siano associazioni tra loro di tipo fisico o dipendente dalla selezione. Un problema rimasto aperto in questo tipo di approccio è la mancanza di una chiara indicazione della confidenza con cui possiamo assegnare un individuo ad una popolazione (Cornuet et al., 2000). Questo problema è legato alla possibilità di associare una probabilità di assegnazione del singolo individuo e di fissare una soglia oltre la quale rifiutare l’assegnazione, perchè considerata

non sufficientemente sicura. Il lavoro di tesi prende in considerazione questo aspetto e fornisce una metodologia in grado di colmare questa lacuna, come descritto più avanti.

I principali metodi di assegnazione basati sullo studio dei genotipi multilocus possono essere raggruppati in tre categorie:

#### 1. Metodo di frequenza

Questo metodo, basato sul concetto di verosimiglianza, è stato proposto da Paetkau et al., 1995 ed assegna un individuo alla popolazione nella quale è più probabile riscontrare il suo genotipo multilocus individuale.

Supponendo che  $J$  loci indipendenti siano stati tipizzati per le  $I$  popolazioni di riferimento e per l'individuo da assegnare, la frequenza dell'allele  $k$  al locus  $j$  nella popolazione  $i$  è:  $p_{ijk}$ . Se assumiamo l'equilibrio di Hardy Weinberg, la verosimiglianza che un genotipo  $A_k A_{k'}$  nella  $i$ -esima popolazione al  $j$ -esimo locus sarà proporzionale a  $(p_{ijk})^2$  se  $k = k'$  e a  $2 p_{ijk} p_{ijk'}$  se  $k$  diverso da  $k'$ . Dal momento che i  $J$  loci sono considerati indipendenti, la verosimiglianza che un genotipo multilocus sia rappresentato in una data popolazione è equivalente al prodotto delle verosimiglianze ad ogni locus. Il metodo consiste quindi di tre step: a) calcolare le frequenze alleliche in ogni popolazione oggetto di studio; b) calcolare la verosimiglianza di riscontrare un genotipo multilocus individuale in ogni popolazione; c) assegnare l'individuo alla popolazione nella quale questa verosimiglianza sia massima.

Oltre alle due assunzioni di partenza, questo metodo considera anche che le frequenze alleliche dedotte dai campioni a disposizione siano rappresentative delle frequenze della popolazione d'origine.

Un caso particolare, descritto da Paetkau et al., 1995, si riscontra quando un allele è rilevato in una sola delle popolazioni analizzate (allele privato). Teoricamente le sua frequenza nelle altre popolazioni dovrebbe essere pari a zero, annullando la verosimiglianza di trovare un individuo portatore di quell'allele nelle popolazioni che ne sono prive. Tuttavia bisogna considerare che, a causa del campionamento, l'allele potrebbe non essere privato (tipico di una sola popolazione), ma raro (presente cioè a frequenze bassissime nelle altre popolazioni). Paetkau risolve il problema assegnando un valore piccolo e costante per gli alleli che presentano questa caratteristica.

## 2. Metodo Bayesiano

Il secondo metodo è stato prevalentemente sviluppato da Rannala e Mountain (1997) e si basa su un approccio Bayesiano per il calcolo della densità di probabilità delle frequenze alleliche della popolazione a partire dalle frequenze del campione analizzato. Assumendo una probabilità a priori equivalente per ogni locus in ogni popolazione, la probabilità di osservare un individuo con genotipo  $A_k A_{k'}$  al locus  $j$  nella popolazione  $i$  è pari a:

1) se  $k=k'$ :

$$\frac{(n_{ijk} + 1/K_j + 1)(n_{ijk} + 1/K_j)}{(n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1)}$$

2) se  $k \neq k'$ :

$$\frac{2(n_{ijk} + 1/K_j)(n_{ijk} + 1/K_j)}{(n_{ij} + 2)(n_{ij} + 1)}$$

Dove  $n_{ijk}$  è il numero di alleli  $k$  riscontrati al locus  $j$  in una popolazione  $i$  (escludendo l'individuo da testare),  $n_{ij}$  è il numero di copie del gene campionate al locus  $j$  nella popolazione  $i$  e  $K_j$  è il numero totale di alleli di tutte le popolazioni al locus  $j$ .

Questo metodo differisce dal precedente principalmente per la base matematica con cui si calcolano i valori di probabilità genotipici. La presenza nel calcolo del coefficiente  $K_j$  elimina il problema del calcolo della frequenza degli alleli unici.

## 3. Metodo della distanza

Mentre i primi due metodi sono basati sulla probabilità di osservare un dato genotipo in varie popolazioni di riferimento, il metodo della distanza, assegna l'individuo alla popolazione più vicina. Esistono numerosi metodi di calcolo delle distanze genetiche, distanze interpopolazione (*chord distance* di Nei, Cavalli Sforza e Edwards) o distanze interindividui (*shared allele distance* di Chakraborty e Jin). Se consideriamo la condivisione allelica (Chakraborty), la distanza di un individuo dalla popolazione equivale alla media delle distanze tra il soggetto e i membri che costituiscono il campione della popolazione. Questo

metodo ha la particolarità di non richiedere l'assunto dell'equilibrio di Hardy Weinberg nè l'assenza di linkage tra loci.

I tre metodi esposti hanno tre caratteristiche in comune:

- si basano su un criterio che correla l'individuo ad ogni popolazione,
- la popolazione che viene scelta è quella che massimizza il valore associato a quel criterio,
- i tre metodi forniscono sempre un risultato, cioè esiste sempre una popolazione più probabile delle altre.

In relazione a quest'ultima caratteristica, è necessario precisare che il set di popolazioni di riferimento potrebbe non includere quella a cui l'individuo effettivamente appartiene. Diventa quindi indispensabile esprimere una misura della confidenza con cui si afferma l'assegnazione individuale.

L'utilizzo come strumento molecolare dei microsatelliti ha l'ulteriore vantaggio di permettere un'analisi della variabilità delle popolazioni per verificare i requisiti preliminari all'analisi di tracciabilità. In particolare sono state analizzate distanze genetiche e parametri di differenziazione tra razze, descritti nella sezione materiali e metodi.

### **6.3 Approccio deterministico: geni della colorazione del mantello**

Il secondo approccio utilizzato si basa sullo studio di mutazioni geniche ed è mirato alla ricerca di polimorfismi specifici di razza. L'analisi dei dati è notevolmente più semplice per questo metodo e meno legata a valutazioni probabilistiche, ma l'applicabilità è ancora condizionata ad una prima fase di ricerca di base allo scopo di evidenziare e confermare delle mutazioni specifiche e identificative delle razze oggetto di studio. Evidenziare una mutazione esistente in tutti gli individui di una razza ed assente in tutte le altre, permetterebbe, con un test molto rapido (singola reazione di sequenza, PCR-RFLP, SSCP, etc.) di identificare la razza senza ricorrere all'inferenza statistica. I geni candidati in questo studio per la ricerca di una mutazione capace di discriminare l'origine razziale di un animale, sono quelli implicati nella colorazione del mantello: i marcatori nei geni del mantello identificati finora sembrano infatti essere molto promettenti ai fini della tracciabilità razziale (Russo e Fontanesi, 2004).

### 6.3.1 Il colore del mantello nei mammiferi

Nei mammiferi il colore del mantello dipende dalla presenza di melanina nella cute e nel pelame. La melanina risiede in organuli citoplasmatici chiamati melanosomi prodotti nei melanociti. I melanociti sono cellule specializzate che migrano dalle creste neurali nel corso dello sviluppo embrionale e risultano fortemente legate alle cellule del sistema nervoso. I melanosomi sono trasferiti dai melanociti dentro cellule dell'epiderma per mezzo di processi di esocitosi. La pigmentazione della cute e dei peli dipende fondamentalmente dalla attività melanogenica e di esocitosi dei melanociti. Per un corretto funzionamento della pigmentazione, dalla cresta neurale, i melanoblasti si devono differenziare correttamente e devono ricevere al giusto momento il segnale per iniziare la loro migrazione verso la destinazione finale. Per una pigmentazione uniforme i melanoblasti devono, non solo disperdersi correttamente, ma differenziarsi in melanociti che a loro volta diventano funzionali. I due principali fenomeni per cui la pigmentazione può essere ridotta o inesistente sono l'assenza o la riduzione dell'attività dei melanociti. Questi fenomeni possono a loro volta interessare solo alcune regioni del mantello o l'intero animale.

### 6.3.2 Le melanine

I pigmenti melanici sono polimeri dal peso molecolare indefinito, che derivano dall'ossidazione enzimatica dell'aminoacido tirosina.

La melanina è presente in due distinti tipi:

*eumelanina*: predomina l'aminoacido tirosina; è responsabile della pigmentazione nera o bruna scura;

*feomelanina*: presenta una quantità variabile di cisteina; conferisce una colorazione che va dal rosso-bruno al giallo.

Entrambi i tipi di melanina sono prodotti da processi di catalisi a partire dalla tirosina e dalla cisteina, il principale enzima coinvolto in questo processo è la tirosinasi. I melanociti sono teoricamente in grado di produrre entrambi i pigmenti, tuttavia essi ne sintetizzano solo uno. Nei melanociti si possono formare due tipi fondamentali di melanosoma:

- **eumelanosoma**, nero o marrone, piuttosto grande, ellittico, bastoncellare, con matrice proteica altamente organizzata;
- **feomelanosoma**, rossiccio, sferico, composto da piccoli granuli aggregati in modo lasso.



Abitualmente i melanociti dell'epidermide producono un solo tipo di melanosoma, un'eccezione a questa regola è rappresentata dal topo *agouti* (colorazione del pelo scura con bande gialle), in cui lo stesso melanocita può sintetizzare un tipo di melanosoma dopo l'altro durante la formazione del pelo. I pigmenti sintetizzati a livello dei melanosomi vengono poi trasferiti ai cheratinociti che li depongono a livello dei peli in fase di crescita.

### 6.3.3 *Il trasporto dei melanosomi*

Quando i melanosomi sono pieni di melanina matura, questa viene trasportata verso le estremità dendritiche dei melanociti in vista del trasferimento a cellule vicine. I dendriti sono costituiti da un cuore centrale di microtubuli e da actina periferica. Nel modello attualmente accettato i microtubuli mediano il trasporto a lunga distanza e l'actina il trasporto vicino.

Il trasferimento dei melanosomi ai cheratinociti è un meccanismo poco conosciuto. Sono stati proposti tre diversi modelli: la fagocitosi delle estremità dendritiche da parte dei cheratinociti, il trasporto attraverso pori di comunicazione intracellulare, l'esocitosi delle melanine seguita da endocitosi da parte dei cheratinociti.

L'esocitosi è il meccanismo più classico ed è il più probabile considerando il fatto che è la via principale operata dai lisosomi, organelli molto simili ai melanosomi, dai quali probabilmente essi hanno origine. Qualunque sia il processo, anomalie nel suo funzionamento hanno ripercussioni sulla colorazione. Pertanto l'intensità del pigmento visibile presente nella cute e nei peli, non è determinato solamente dall'attività pigmentaria dei melanociti, ma anche dalla velocità di trasferimento e dal modo di distribuzione dei melanosomi ai cheratinociti.

Numero, tipo, dimensioni e modalità di distribuzione dei melanosomi nei tessuti epidermici sono tutte caratteristiche sotto controllo genetico.

### 6.3.4 *La melanogenesi*

La sintesi di eumelanina da parte del melanocita dipende dalla presenza dell'alfa-melanocyte-stimulating hormone (alfa-MSH) di origine pituitaria. Nella superficie cellulare dei melanociti risiede il recettore MC1R (MelanoCortin Receptor type 1) per l'ormone alfa-MSH e una volta che il recettore interagisce con l'ormone si innesca il biochimismo di sintesi della eumelanina. Nei casi in cui non ci sia l'interazione fra recettore e ormone, o nel caso del legame della proteina antagonista Agouti, i melanociti sintetizzano la feomelanina. L'attività di sintesi di un dato pigmento è data quindi dall'azione di innesco fra recettore e

ormone. Il controllo dell'attività dei melanociti è regolato da una serie di mutazioni geniche che in maniera diversa intervengono in fasi diverse dei processi di melanogenesi.

- alcuni loci influenzano la differenziazione cellulare o migrazione dei melanociti dalla creste neurali durante le fasi di sviluppo embrionale;
- altri loci condizionano la morfologia dei melanociti e la loro capacità di depositare i melanosomi nelle cellule differenziate della cute;
- altri loci definiscono alcune componenti enzimatiche coinvolte nei processi di melanogenesi;
- alcuni loci influenzano l'interazione fra l'ormone alfa-MSH e le cellule bersaglio. L'interazione di tutte queste componenti geniche porta alla definizione del colore del mantello degli animali.

#### *6.3.5 Classificazione dei mantelli*

I colori fondamentali per definire il colore dei mantelli sono il bianco, il rosso ed il nero.

Per tutte le specie i mantelli sono classificabili in:

- semplici: peli di un unico colore
- composti: peli di due o più colori
- pezzati: presentano macchie di peli di colore differente da quello di base

Sul colore del mantello influiscono altri fattori: età dell'animale, stato di salute, sesso e condizioni ambientali.

#### *6.3.6 Il colore dei mantelli degli ovini*

Il pelame che ricopre gli ovini è costituito da peli che differiscono per costituzione, diametro e lunghezza (giarra, lana).

La lana origina dal sottopelo dei mantelli: l'evoluzione, unitamente alla selezione, hanno portato a farla prevalere sui peli.

La lana differisce dal pelo per struttura (assenza di midollo e diametro inferiore) e perché non è interessata da processi di muta in quanto è a crescita indeterminata.

Il mantello degli ovini è meglio definito dal termine "vello"; la lunghezza della fibra definisce ovini in razze a: lana lunghissima (15-20cm), lana lunga (9-14 cm) e lana corta (meno di 8 cm).

La copertura del corpo con lana può riguardare parte del corpo o quasi l'intera superficie cutanea. In genere la testa, le orecchie le regioni ventrali del collo e del tronco e le parti distali degli arti sono ricoperte da peli.

Il colore del vello può essere bianco (Sarda), grigio (Massese), nero, rossiccio e pezzato: esistono razze in cui al colore chiaro del vello sono associati i peli di altro colore che ricoprono la testa e gli arti (Suffolk, Comisana).

Il colore del mantello degli ovini oltre che essere condizionato dai meccanismi che regolano la sintesi dei pigmenti nei melanociti è influenzato in maniera piuttosto determinante dalle caratteristiche della struttura del pelame (G. Battacone).

In generale, le fibre originate dai follicoli primari sono potenzialmente pigmentati di scuro, mentre le fibre dei follicoli secondari hanno meno possibilità di avere colorazione scura.

Questo comporta che nelle pecore siano rari i mantelli con colorazioni scure: ciò è maggiormente osservato nelle razze caratterizzate da lana con struttura fine o media, mentre appare meno vero per razze ovine con lana a fibra grossa.

Uno dei loci fondamentali per la definizione del colore del mantello degli ovini è il locus *Agouti*: questo locus ha diverse varianti alleliche che ne fanno uno dei loci più complessi nel definire il colore degli ovini.

Il locus *Agouti* è responsabile della sintesi della proteina che annulla l'interazione fra l'alfa-MSH e il melanocita: pertanto, nelle regioni del corpo dove questa proteina è presente, viene meno la sintesi della eumelanina per cui il solo pigmento sintetizzato è la feomelanina.

Negli ovini è abbastanza frequente l'inversione del tipo di pigmentazione, per cui le regioni che sono eumelaniche in un tipo di mantello, possono essere feomelaniche in un altro e viceversa. L'azione dell'allele *Agouti* porta all'espressione delle aree feomelaniche su background eumelanico: questo comporta che le regioni bianche o pallide del mantello prevalgano su quelle scure.

L'allele dominante nel locus *Agouti* è il "*White*" che pertanto definisce la maggior parte dei fenotipi bianchi (feomelanici), mentre l'allele *Agouti* recessivo è portatore del fenotipo eumelanico completo. Fra i mantelli completamente bianchi e quelli interamente neri esiste una vasta serie di mantelli dove prevale una o l'altra pigmentazione.

Altro locus di particolare importanza nella definizione del colore del mantello degli ovini è quello indicato come "*Extension*": questo locus codifica per un gruppo di 7 recettori dell'alfa-MSH. L'interazione fra il locus *Extension* e il locus *Agouti* è determinante nel definire il colore del mantello. L'allele dominante dell'*Extension* è il *Black*: questo allele comporta mantelli uniformemente neri.

La prevalenza dei mantelli bianchi nelle regioni dove la lana bianca è quella preferita è dovuta al fatto che gli allevatori hanno spinto la selezione verso animali privi dell'*Extension* dominante. Altri loci sono responsabili della differente tonalità del colore dei mantelli pigmentati da feomelanina: i principali sono i loci *Brown* e *Dark Brown*.

Altri loci ancora regolano la presenza di macchie bianche indipendentemente dal colore del mantello.

### 6.3.7 Geni oggetto di studio

I geni della colorazione comprendono tutti quei geni che influenzano il colore della pelle, del pelo e degli occhi di un animale. Il topo rappresenta la specie modello per lo studio di questo fenomeno e già nel 1979 si conoscevano 130 mutazioni presenti in 50 diversi loci implicate nel determinismo del colore del mantello murino (Silvers, 1979).

Tutti questi geni possono essere classificati secondo il processo che influenzano all'interno della determinazione della colorazione del mantello.

Nella sintesi delle melanine sono prevalentemente implicati tre enzimi: TYR (Tyrosinase), TYRP1 (Tyrosinase Related Protein 1) e DCT (Dopachrome Tautomerase o Tyrosinase Related Protein 2). L'attività di questi enzimi è controllata dal recettore MC1R, una proteina che nelle pecore è di 325 aminoacidi, dal suo ligando  $\alpha$ -MSH e dall'antagonista Agouti. Altri enzimi importanti per la pigmentazione agiscono a livello dello sviluppo dei melanosomi e del sistema di trasporto all'interno dei melanociti epidermici. Un altro punto critico nella definizione della pigmentazione è il trasferimento dei melanosomi ai cheratinociti dove i pigmenti svolgono la loro funzione.

### MC1R

Un locus responsabile di una gran parte delle variazioni di colore è il locus *Extension*, caratterizzato a livello molecolare inizialmente nel topo, codifica per il Melanocortin receptor 1 (MC1R) indicato anche come Melanocyte stimulating hormone receptor (Robbins et al., 1993) che è una proteina transmembrana della famiglia dei G-protein-coupled receptors. Oltre che nel topo, anche nell'uomo (Valverde et al., 1995), nel cavallo (Marklund et al., 1996), nella pecora (Våge et al., 1999), nel pollo (Takeuchi et al., 1997), nel suino (Kijas et al., 1998), nelle capre (Fontanesi et al. 2009b) e nel coniglio (Fontanesi et al. 2006),

diverse mutazioni nel gene *MC1R* sono state associate a differenti colori del mantello. Nel bovino sono stati identificati diversi alleli al locus *MC1R* (Klungland et al., 1995; Joerg et al., 1996; Rouzaud et al., 2000; Kriegesmann et al., 2001; Graphodatskaya et al., 2002; Maudet e Taberlet, 2002b). Di questi, tre sono i principali: l'allele "wild type"  $E^+$  riconducibile a più di una mutazione e quindi a diversi alleli, che produce diverse colorazioni; l'allele dominante  $E^D$ , caratterizzato da una mutazione puntiforme che cambia l'aminoacido e che determina il colore nero del mantello; l'allele  $e$ , caratterizzato da una delezione puntiforme che causa uno slittamento nella lettura dei codoni e quindi una proteina non funzionale che in condizioni omozigoti determina il colore rosso del mantello.

Negli ovini il locus è stato localizzato nel cromosoma 14 e anche in questa specie sono state identificate diverse varianti alleliche (Klungland et al., 1999; Klungland et Vage, 1999, 2003; Fontanesi et al., 2010a): l'allele  $E^D$  è responsabile del fenotipo nero dominante (Met®Lys in posizione 73 (M73K) insieme al cambiamento Asp®Asn in posizione 121 (D121N) (Dag Inge Våge et al 1998), mentre l'allele  $E^+$  è responsabile del fenotipo bianco.

E' stata studiata in particolare la pigmentazione nelle pecore Black-boned (*Ovis aries*), così dette in quanto mostrano una pigmentazione scura non solo del mantello, ma anche della pelle, dei tessuti degli organi interni e del plasma, e l'associazione con il polimorfismo del gene *MC1R* (Deng WD et al. nel 2007). Dal sequenziamento dell'intera regione codificante di questo gene nelle pecore Black-boned, nelle pecore indigene del Nanping, che mostrano invece un mantello nero o misto bianco e nero e nelle Romney Marsh, interamente bianche, sono state trovate due mutazioni silenti A12G e G144C (Deng WD et al. nel 2007) che non hanno tuttavia influenza sui tratti del nero delle pecore in questione. Questo locus è stato oggetto di studio per l'identificazione di marcatori specifici delle razze bianche da carne italiane (Crepaldi et al., 2003) e la sua utilità ai fini della tracciabilità razziale attraverso la ricerca di mutazioni private è stata descritta da D'Alessandro et al. (2007) per il maiale nero della Sicilia, da Russo et al. (2007) per l'autenticazione e la protezione da azioni fraudolente del Parmigiano Reggiano, prodotto esclusivamente con latte di Reggiana e da Maudet et al. (2002b) che hanno mostrato l'efficacia dei polimorfismi nel gene *MC1R* non solo per individuare la presenza di latte di Frisona Francese nei formaggi per cui non ne è consentito l'utilizzo, ma anche per assegnare una carcassa alla propria razza di origine.

### *La famiglia dei geni della tirosinasi*

I tre enzimi Tyrosinase, Tyrosinase Related Protein 1 e Tyrosinase Related Protein 2 (o Dopachrome Tautomerase), sono i tre principali attori della via biosintetica dei pigmenti melanici. In modo particolare il primo enzima è coinvolto nella prima tappa della via biosintetica delle melanine e in più stadi a valle. Per molti anni la tirosinasi è stata considerata l'unico enzima responsabile della produzione delle melanine nei melanociti. Questo enzima catalizza l'idrossilazione a L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) e l'ossidazione del DOPA a DOPAquinone. Oltre a queste due note attività è stato trovato un altro ruolo della tirosinasi, l'ossidazione del dihydroxyindol (DHI).

L'azione di TYRP1 è collegata alla sua attività dihydroxyindol carboxylic acid (DHICA) ossidasica. TYRP2 ha un'attività Dopachrome tautomerica (DT), isomerizza l'intermedio Dopachrome a DHICA. Quindi TYRP2 produce DHICA che serve da substrato a TYRP1. L'associazione di TYRP1 con la produzione di eumelanina piuttosto che feomelanina in linee cellulari di melanomi umani, ne ha evidenziato il ruolo specifico nel facilitare gli stadi distali nella produzione del pigmento scuro. Le tre proteine sono codificate da geni distinti localizzati su differenti cromosomi ma condividono una similarità di sequenza tale da renderle parti di una famiglia proteica, la famiglia delle tirosinasi. Il locus della tirosinasi (locus *c albino*) mappa nel topo sul cromosoma 7 (Kwon et al., 1987) e la sua sequenza aminoacidica ha un'alta omologia con il gene umano (Muller et al., 1988). TYRP1 e TYRP2 mappano nel topo al locus *b (brown)* e *slt (slaty)* (Jackson 1988; 1992) e anch'essi mostrano alta omologia con l'uomo (93 e 84% rispettivamente). Il grado di omologia tra questi tre geni invece è minore, intorno al 40-50% (Guibert et al., 2004).

Tra le mutazioni conosciute, la più studiata è certamente la mutazione albino che caratterizza topi bianchi completamente privi di pigmento a causa di una tirosinasi totalmente inattiva (Jackson e Bennett, 1990). La stessa mutazione è stata descritta nell'uomo ed è associata ad una patologia conosciuta come Albinismo Oculocutaneo di tipo 1 (OCA1A, Albinism Database: <http://albinismdb.med.umn.edu/>). Altre mutazioni conosciute causano depigmentazioni meno severe, come nel topo chinchilla che possiede una parziale attività della tirosinasi. La mutazione conosciuta come "brown", colpisce l'enzima TYRP1, che agisce più a valle nella biosintesi delle melanine e provoca la comparsa di un fenotipo marrone. Nell'uomo, questo enzima è implicato nell'Albinismo Oculocutaneo di tipo 3 (OCA3), caratterizzato da una depigmentazione parziale della pelle, degli occhi e dei capelli. Il terzo gene della famiglia, *DCT*, anch'esso implicato a valle della catena sintetica, non è associato nell'uomo ad alcuna forma di albinismo. Al contrario nel topo è associato al

fenotipo denominato “slaty”, caratterizzato da un colore nel mantello leggermente diluito, dovuto ad una perdita parziale dell’attività di DCT (Jackson et al., 1992).

Nelle pecore sono state identificate due mutazioni silenti nell’esone 1 del gene *TYR* della Tirosinasi: G192C and C462T nelle pecore Black-boned, nelle pecore del Nanping e nelle Romney Marsh (Deng WD et al. 2007), in cui però non è evidente che la pigmentazione nera delle pecore Black-boned sia causata da questo polimorfismo. Emerge comunque l’utilità dei marcatori genetici nella forma di polimorfismi dei geni per la ricerca di mutazioni causa del colore del mantello. Altre due mutazioni significative sono state identificate nel gene *TYR* delle pecore Black-bone dello Yunnan, localizzate al 64 ed al 154 codone, ed entrambe sono mutazioni sinonime (Yang SL et al 2006). Qui invece è presente una correlazione significativa tra il polimorfismo del gene ed il colore del mantello delle pecore ( $P < 0.01$ ), indicando che il gene *TYR* può influenzare la sintesi del colore del mantello. Le pecore Black-boned presentano quindi una colorazione più scura del plasma ed un’attività tirosinasi significativamente più alta rispetto alle pecore normali. Anche i geni *TYRP1* e *TYRP2* sono stati oggetto di studio in queste pecore: la tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) è codificata da un gene che è stato mappato in studi precedenti al locus del colore del mantello in un range di 15cM sul cromosoma 2. L’analisi della regione codificante di *TYRP1* delle pecore Black-boned ha rivelato due polimorfismi: una trasversione C>T nell’esone 2 alla posizione 102 ed una trasversione T>C nell’esone 2 alla posizione 215 (DQ645485–DQ645488). Quest’ultima è una mutazione missenso provocando infatti la sostituzione valina-alanina al codone 68 (Val68Ala), mentre la mutazione 102C>T non altera la sequenza amminoacidica (Deng WD et al 2006). Questi risultati indicano che esistono quindi differenze tra le pecore normali e Black-boned. Sono state identificate anche le sostituzioni 90C>T e 203C>T in *TYRP1*, sinonima e missenso rispettivamente, ma sia nelle pecore Black-boned (DQ645485– DQ645488) che in quelle normali (DQ645489–DQ645492) sono presenti tutte e quattro le combinazioni genotipiche (CT/CC, CT/CT, CC/CT e CC/CC, tutte rappresentanti le posizioni 90/203 rispettivamente). Quindi, l’attività tirosinasi risulta essere significativamente affetta dal TYR e dal MC1R ( $P < 0.01$ ), ma non dal TYRP1 nè dall’ASIP. Nelle pecore Soay è stata identificata una sostituzione non sinonima nell’esone IV (G>T) causante la perdita di cisteina residua e perfettamente associata con il determinismo del colore del mantello: ciò ha dato evidenza che la sostituzione di un singolo nucleotide nel gene *TYRP1* è responsabile del polimorfismo del colore in queste pecore, che mostrano sia un colore del mantello bianco che marrone (Gratten J et al 2007). Il colore chiaro è dato dalla presenza in omozigosi della mutazione

recessiva sopra descritta (TT), mentre le pecore scure possono essere eterozigoti (GT) o omozigoti (GG). Le pecore scure rappresentano circa i due terzi della popolazione, ma questa proporzione è andata diminuendo fortemente negli ultimi 20 anni: questo perché è stata dimostrata associazione tra il colore scuro e la taglia corporea di grandi dimensioni, correlata positivamente con il successo riproduttivo e di sopravvivenza. Quindi le pecore scure GG saranno di elevate dimensioni e avranno una fitness ridotta rispetto alle pecore GT e TT. Per quanto riguarda il gene tyrosinase-related protein2/DOPAchrome tautomerase, sono stati amplificati e caratterizzati tutti gli 8 esoni e le loro regioni fiancheggianti a partire dal cDNA del gene *TYRP2* nelle pecore Black-boned (Deng W et al 2009). Sono stati identificati 15 single nucleotide polymorphisms (SNPs), di cui 5 siti polimorfici esonici comprendenti 2 mutazioni sinonime (c.93T>G e c.1140C>T) e 3 mutazioni non sinonime (c.163C>T (p.R55W), c.605G>A (p.R202H), e c.1141A>G (p.T381A)). Non è stata dimostrata un'associazione tra il genotipo di *TYRP2* con il colore del mantello, anche se le due razze con più alta attività tirosinasi producono colore più scuro del mantello delle razze con una bassa attività tirosinasi.

### *ASIP*

Differenze nell'espressione del gene *ASIP* sono coinvolte nel colore nero recessivo nelle pecore: nella razza ovina Xalda infatti, è stata ipotizzata un'associazione tra i differenti livelli di mRNA dell'agouti signalling peptide (ASIP) ed il nero recessivo di questa razza. E' stata ipotizzata una possibile azione congiunta dell'allele *Extension* (*ED*) del nero dominante e della delezione di 5-bp (*Adel*) trovata nella sequenza codificante dell'*ASIP* ovino nella formazione del colore nero nella razza Xalda (Royo et al 2008). Tuttavia il genotipo *Adel/Adel* non è la sola causa del nero recessivo nelle pecore ed il genotipo dell'*ASIP* non influenza il livello di espressione del mRNA. Occorre isolare la regione del promotore per meglio comprendere il ruolo dell'*ASIP* nella formazione del nero recessivo. Non sono state trovate inoltre differenze nella sequenza dell'*ASIP* delle pecore Black-boned e quelle normali (DQ531713 e DQ531714 rispettivamente). E' stata trovata invece una duplicazione genica influenzante l'espressione del gene *ASIP* ovino e responsabile del colore bianco e nero nelle pecore (Belinda J. Norris and Vicki A. Whan 2008). Questa duplicazione di 190-kb in tandem tra le regioni codificanti dell'*ASIP* e dell'*AHCY* ovino e la regione promotrice *ITCH* è stata identificata come la causa genetica del colore bianco e del colore dominante



white/tan (*AWt*) nell'Agouti delle pecore. La duplicazione 5 breakpoint è localizzata upstream della regione codificante l'*ASIP*. L'espressione ubiquitaria della seconda copia della regione codificante l'*ASIP* è regolata dalla copia duplicata del vicino promotore *ITCH* che causa il fenotipo bianco delle pecore. Una singola copia del gene *ASIP* con un promotore *ASIP* silente si ha invece nel nero recessivo delle pecore, mentre una singola copia funzionale wild-type (*A+*) dell'*ASIP* è responsabile del fenotipo dei mufloni antichi (*Ammotragus lervia*). La duplicazione del gene è facilitata dalla ricombinazione omologa tra le due sequenze SINE non-LTR fiancheggianti il segmento duplicato. Questo è il primo tratto attribuibile alla duplicazione genica grazie a questa ricombinazione omologa non allelica ed agli eventi di conversione genica al locus *ASIP* ovino che potrebbero avere un ruolo importante nell'evoluzione della pigmentazione delle pecore. Questo gene e la sua influenza sul colore del mantello è stato ampiamente descritto anche nella capra (Fontanesi et al. 2009c; Badaoui et al. 2011), nel coniglio (Fontanesi et al. 2010b) e nella pecora Massese (Fontanesi et al. 2011b) in cui viene dimostrata l'associazione tra il colore del mantello e mutazioni in *ASIP* ed *MC1R*.

### *SILVER*

Il gene *SILV* gioca un ruolo fondamentale per lo sviluppo del melanosoma: infatti è oggetto di studio per la diagnosi del melanoma e per lo sviluppo di terapie nell'uomo, come anche per la pigmentazione del colore della pelle e del mantello in molte specie, come il pesce zebra e molti mammiferi. Allo stato attuale i meccanismi cellulari nei quali *SILV* è coinvolto non sono ancora completamente capiti. Ci sono molti studi che danno a *SILV* la funzione sullo sviluppo del pigmento eumelanico come fondo, mentre non si sa ancora la rilevanza di *SILV* per lo sviluppo del feomelanosoma (Kuehn C and Weikard R 2007). Sono stati definiti tre tratti differenti che rappresentano la diluizione della feomelanina, dell'eumelanina e la diluizione non pigmento specifica. E' stata identificata una mutazione non sinonima nell'esone 1 del gene *SILV* 64A>G ed è stata associata alla diluizione del mantello. Analisi ulteriori hanno identificato una regione sul cromosoma 28 che influenza la variazione nell'intensità del pigmento (Gutiérrez-Gil B et al 2007). La scoperta della proteina Pmel17 amiloide nei mammiferi fornisce informazioni chiave sulla base molecolare sia della formazione della melanina che delle patologie amiloidi (Fowler DM et al 2006). La proteina amiloide Pmel17 infatti, oltre che essere associata a condizioni patologiche come

l'Alzheimer ed il diabete, è coinvolta nella pigmentazione della pelle dei mammiferi (Maji SK et al 2009). Il processo di amiloidogenesi è associato infatti ad una grande varietà di malattie neurodegenerative, quali il già menzionato morbo di Alzheimer, il morbo di Parkinson e la malattia di Huntington, ma è stata trovata una delezione di 3 bp nell'esone 1 del gene *PMel17* associata alla diluizione ed all'ipotricosi nel bovino (Jolly RD et al 2008). E' stato ritenuto quindi interessante studiare questo gene anche negli ovini, con lo scopo di ricercare possibili mutazioni razza-specifiche coinvolte nella formazione del colore del mantello.

L'oggetto di questa tesi è lo studio del polimorfismo dei geni *MC1R*, *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *ASIP* e *SILVER* in sette razze ovine autoctone dell'Italia meridionale continentale: Sarda, Comisana, Leccese, Altamurana, Bagnolese, Gentile di Puglia e Laticauda, allo scopo di fornire un contributo sperimentale verso la ricerca di possibili mutazioni specifiche di razza finalizzate alla tracciabilità razziale.

## MATERIALI E METODI

### 7 Razze oggetto di studio



Figura 1: Le 7 razze oggetto di studio

#### 7.1 Altamurana

##### *L'origine e l'area di allevamento*

La razza ovina Altamurana, con una lunghissima tradizione di allevamento nella Murgia di Nord Ovest, si è selezionata nelle aree più povere della dorsale pugliese ed ha visto periodi di particolare attenzione ed espansione per le sue doti di rusticità, ma anche per le pregevoli qualità della sua lana, determinate dall'ideale rapporto tra vello e sottovello, che ne garantiva una perfetta idoneità alla destinazione "materasso", meglio della lana di ogni altra razza a vello aperto. Deriva dalla razza popolazione cosiddetta "Moscia" per i filamenti lanosi poco increspati e cadenti del suo vello, le cui origini sembrano risalire alla razza asiatica o siriana del Sanson (*Ovis aries asiatica*) e più propriamente alla sottorazza chiamata Zackel dai Tedeschi e Tzourkana dai Romeni (Pacces *et al.* 1878, cit. da Ferrante, 1966; Mannarini, 1912, cit. da Visicchio. 1931; De Paolis. 1954) giunta in Puglia all'epoca delle invasioni saracene. Dalla primitiva ed unica razza, nel corso dei secoli, in relazione alle condizioni ambientali e all'indirizzo dato dagli allevatori, si sarebbero originate in seguito due sottorazze: la "Moscia Barese" o "della Murgia" o "Altamurana", a vello e faccia completamente bianchi e la "Moscia Leccese", a faccia ed arti neri, della quale esistono

soggetti neri anche nel vello (Jovino, 1930; Visicchio, 1931; Ovile Nazionale di Foggia, 1932), che deriverebbe dalla primitiva per selezione contro la ipericodermatosi, dermatite da fotosensibilizzazione provocata dalla ingestione di *Hypericum triquetrifolium* Turra o *H. crispum* L. (Montemurro, 1963) molto frequente nel Salento e localmente detto “fumolo”. Il crollo del materasso e del cuscino di lana ha molto contribuito alla riduzione del tornaconto economico degli allevamenti di questa razza e gli allevatori hanno tentato di trovare maggiori soddisfazioni ai propri bilanci, soprattutto nelle espressioni quantitative della produzione del latte. Si è determinato così un rapido decadimento demografico della pecora Altamurana con l'introduzione di animali di altre razze di varie provenienze; gli allevamenti che hanno conservato una base genetica Altamurana hanno quasi tutti praticato incroci e meticciammenti con la Moscia Leccese o con razze provenienti da altre aree italiane (Sicilia e Sardegna), provocando una violenta deformazione dell'originale genotipo. Della pecora Altamurana sono state così trascurate le non più remunerative proprietà della lana, ma sono state anche troppo spesso sottovalutate le proprietà qualitative del latte, migliori rispetto a quelle razze di nuova introduzione. Verso la fine degli anni 50, gli ovini di razza Altamurana erano allevati a sistema brado, prevalentemente nelle piccole e medie aziende della provincia di Bari, nel comune di Altamura e nei territori di Andria, Bitonto, Corato, Minervino, Ruvo, Spinazzola e Terlizzi ed, in minor quantità, anche nella provincia di Foggia. Nel 1958 la razza era localizzata genericamente nella Murgia barese e l'area di allevamento estesa a comprendere, oltre alle Province di Bari e Foggia, anche quelle di Potenza e Matera. Oggi l'areale di diffusione della razza Altamurana è limitato a pochi allevamenti delle province di Bari e di Foggia. I soggetti di razza Altamurana, di mole medio-piccola, ma costituzionalmente robusti e precoci nello sviluppo, si sono rivelati buoni utilizzatori dei pascoli murgiosi, sfruttando in maniera più che soddisfacente la scarsa vegetazione delle Murge, con pascoli spesso in pendenza, su terreni poco profondi e rocciosi, molto siccitosi. I pascoli della Murgia sono molto estesi, ma poco ricchi di essenze pabulari, in genere presentano una vegetazione a scarso sviluppo a causa del particolare regime pluviometrico cui soggiace la regione, dello spessore del terreno e della dispersione dell'acqua nel sottosuolo.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive di razza*

I soggetti di razza Altamurana sono a vello bianco aperto e di mole medio-piccola; costituzionalmente robusti e precoci nello sviluppo, sono buoni utilizzatori dei pascoli murgiosi. L'Altamurana è ricordata come una pecora a triplice attitudine: latte, carne e lana.

La lana, pur considerata tra le migliori lane italiane da materasso, è divenuta un prodotto marginale del gregge, visto lo scarso peso economico dovuto al rapido progresso delle fibre sintetiche e dei materassi a molle. Il latte e la carne della pecora Altamurana non hanno mai garantito forti guadagni, sia per la mole medio-piccola, che per le scarse produzioni di latte. Queste motivazioni hanno spinto gli allevatori ad orientarsi verso un miglioramento della produzione del latte, attraverso l'incrocio, prima con l'affine razza Leccese e poi con razze a più spiccata vocazione lattifera.

Lo Standard e le norme tecniche della razza Altamurana sono state approvate con D.M. 22 Aprile 1987, che ha recepito modifiche rispetto al D.M. del 1958.

#### *Caratteri tipici*

*Taglia:* medio-piccola (50 kg nei maschi e 35-40 kg nelle femmine)

*Testa:* leggera, allungata, con profilo montonino e presenza a volte di corna corte nei maschi; acorne e profilo rettilineo nelle femmine. Orecchie piccole orizzontali, ciuffo di lana in fronte.

*Collo:* lungo e poco muscoloso.

*Tronco:* dorso e lombi rettilinei, groppa spiovente e non larga, addome rotondo e voluminoso, coda lunga e sottile, mammella sviluppata, globosa, ben attaccata, con pelle fine e capezzoli mediamente sviluppati.

*Arti:* lunghi e dritti, con appiombi regolari; unghie solidi di colore avorio.

*Vello:* bianco, aperto, biocchi appuntiti, esteso con filamenti pendenti, lunghi e lucenti; coprente il tronco, collo, base del cranio e coda.

*Pelle e pigmentazione:* sottile, elastica, bianco-rosata, piccole macchie rotondeggianti di colore scuro o grigiastro sulla faccia e parti inferiori degli arti.

*Altezza media al garrese:*

- Maschi a. cm. 71

- Femmine a. cm. 65

*Peso medio:*

- Maschi adulti Kg. 53

- Femmine adulte Kg. 39

*Produzioni medie:*

Latte: lt. 80 - 120

(contenuto in grasso 7,5% proteine 6,5%)

Carne: - Maschi a. Kg. 38

- Femmine a. Kg. 36

Lana: (in sucido)

- Arieti Kg. 3

- Pecore Kg. 2

## **7.2 Bagnolese**

### *Origine e diffusione*

La derivazione più probabile del tipo genetico autoctono ovino Bagnolese, per le particolari caratteristiche somatiche, sembra essere l'ovino di razza Barbaresca. La zona di allevamento della Bagnolese è identificabile nel comune di Bagnoli Iripino (AV), da cui ne deriva il nome, dove sarebbero allevati circa 5.000 soggetti, anche se solo 1.500 riconducibili per le loro caratteristiche somatiche a questa popolazione (Zicarelli, 1988). Nella Regione Campania, i soggetti appartenenti al tipo genetico Bagnolese vengono stimati intorno ai 35.000 capi (Barone *et al.* 1999), mentre nel 1983 Rubino *et al.* stimavano una consistenza pari a circa 20.000 capi. L'area di diffusione interessa principalmente i monti Picentini, gli Alburni, il Vallo di Diano, la Piana del Sele (province di Salerno e di Avellino) e, marginalmente, la pianura del Casertano e le colline del Beneventano. Questo tipo genetico riveste notevole interesse per le sue caratteristiche riproduttive e produttive, sia di latte che di carne, che sono da ritenersi più che soddisfacenti, in relazione alle condizioni ambientali difficili in cui è allevato. Gli animali vengono allevati in greggi di piccole e medie dimensioni (50-300 capi), raramente costituiti solo da soggetti Bagnolese, data la contemporanea presenza di capi appartenenti ad altri tipi genetici e ad altre popolazioni, comportando inevitabilmente un alto grado di meticciamiento. Se fino ad una decina di anni fa il sistema di allevamento prevalente era quello pastorale, caratterizzato dall'utilizzazione scalare di aree pascolive fra di loro più o meno lontane, oggi è in atto una tendenza all'adozione di quello stanziale brado, caratterizzato dall'utilizzazione delle risorse alimentari pabulari di vasti territori, nonché dall'integrazione alimentare in ricoveri utilizzati, a volte, anche per le operazioni casearie (Rubino *et al.* 1983). La genuinità del prodotto è garantita dall'alimentazione naturale, dalle piccole dimensioni degli allevamenti, a gestione familiare e lontani dai grandi insediamenti urbani. L'utilizzazione dei pascoli, già di per sé inadeguati rispetto al carico di animali, è affettuata, nella maggioranza dei casi, in modo irrazionale, con gravi ripercussioni non solo sulla produttività delle stesse aree pascolive pabulari e, di conseguenza, su quella degli animali, ma anche sullo stato sanitario, favorendo

il diffondersi di malattie infettive e di parassitosi interne. L'agnello Bagnolese viene in genere alimentato esclusivamente con il latte materno e ciò contribuisce a rendere la sua carne particolarmente tenera e delicata. Il latte, ricco di proteine e con una elevata attitudine alla caseificazione, costituisce la materia prima per produrre formaggi pecorini e ricotta.

L'ovino Bagnolese è iscritto al Registro Anagrafico delle popolazioni Ovine e Caprine autoctone a limitata diffusione, che rappresenta lo strumento per la conservazione e la salvaguardia delle popolazioni ovine che sono state ammesse e ne promuove la valorizzazione. Esso è regolato da un apposito Disciplinare approvato con D.M. 28 Marzo 1997, in accordo con la normativa comunitaria.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive di razza*

*Taglia:* medio-grande.

*Testa:* piuttosto leggera con profilo montonino, più specie nel maschio. Il maschio presenta spesso robuste corna avvolte a spirale e dirette dal basso verso l'alto all'infuori. Le orecchie sono di media grandezza, portate orizzontalmente e talvolta leggermente pendenti.

*Collo:* robusto, ben attaccato alla spalla ed al garrese.

*Tronco:* lungo con ampio torace, linea dorso-lombare-sacrale leggermente ascendente in senso antero-posteriore, spalla ben legata al torace, dorso e lombi larghi, allungati e muscolosi, addome di media ampiezza. La coda, piuttosto lunga, con alla base un lipoma poco sviluppato e, a partire dal terzo superiore, si prolunga assottigliandosi fino al di sotto dei garretti.

*Arti:* gli arti in appiombio sono lunghi, robusti, asciutti, con unghie di colore grigio scuro e ben conformati.

*Apparato mammario:* mammella saldamente attaccata, voluminosa, tessuto spugnoso ed elastico; capezzoli di giuste dimensioni ed uniformi.

*Vello:* bianco, con bioccoli conici, su tutto il tronco ad esclusione della faccia ventrale, della regione inferiore del collo, della testa e degli arti. La testa, il collo e le estremità degli arti presentano delle picchiettature nere tipiche che, in alcuni soggetti, possono essere delle ampie macchie nere.

*Pelle e pigmentazione:* elastica e di colore rosa chiaro.

Popolazione caratterizzata da ciclo sessuale poliestrale stagionale, caratterizzata da elevata prolificità.

*Altezza media al garrese:* 74,5 cm

*Peso medio:* - maschi kg 95

- femmine kg 58

Razza a duplice attitudine latte e carne, con alta percentuale di parti gemellari.

### **7.3 Laticauda**

#### *Origine e diffusione*

Come la razza Laticauda (o Barbaresca campana, Bastarda arianese, Beneventana, Casalinga, Casereccia, Coda chiatta, Nostrana) sia giunta in Italia e abbia dato origini ad un ovino con le attuali caratteristiche morfo-funzionali, non è molto chiaro. Sarebbe logico supporre che tale ovino sia il risultato di incroci e meticcamenti, spesso casuali e protratti, quasi certamente in modo discontinuo, per un lungo periodo di tempo, dell'ovino locale, ascrivibile alla più estesa popolazione appenninica, con la pecora Berbera o Barbaresca, di origine nord africana, con la quale ha in comune parecchie caratteristiche, tra le quali, forse la più immediata, è la coda adiposa e voluminosa da cui infatti deriva il nome (Laticauda letteralmente significa "coda larga"). Ma non è chiaro come e quando gli ovini Berberi siano arrivati in Italia e particolarmente in Campania, anche se il Mazzone (cit. da Pelosi, 1991) afferma che importazioni notevoli di ovini Berberi avvennero durante la dominazione Borbonica; l'area principale di allevamento era, allora, nella vecchia provincia di Napoli e, solo in tempi più recenti, si spostò nella provincia di Capua. I primi studi su questo tipo genetico, a nostra conoscenza, risalgono al 1937, quando Gaetano Nevano si interessò della popolazione ovina allevata nel Sannio e del loro miglioramento. In particolare, il Nevano concentrò il suo studio sugli ovini allevati nei comuni di Castello D'Alife, di Pietraroia, di Morcone e di San Giorgio La Molar, rilevando le caratteristiche somatiche degli ovini Laticauda allevati nelle province di Avellino e Benevento ed i risultati lasciano supporre che il tipo genetico Laticauda si sia formato in seguito ad una serie di incroci e di meticcamenti non sempre oculati e, certamente, non condotti secondo una rigorosa metodica razionale (Pelosi, 1991). Con il decreto ministeriale dell'11-05-1981 è stato istituito il Libro Genealogico del Tipo Genetico Ovino Laticauda, considerato uno dei più pregiati tipi genetici da carne italiani. Infatti, la carne di Laticauda è molto ricercata per la delicatezza del sapore e dell'aroma, mentre il latte, di qualità eccellente e con un'elevata attitudine alla caseificazione, è utilizzato come materia prima per la produzione di formaggi pecorini con caratteristiche organolettiche uniche. E' quindi la tipica razza a duplice attitudine con produzione di latte che si aggira in media su 80 Kg con resa in formaggio di tipo



caciotta del 20%, ed in ricotta del 6%, con contenuto in grasso variabile dal 6 all'8%. Il tipo genetico ovino Laticauda è, attualmente, allevato nelle province di Benevento, Avellino e Caserta, nonché sul Matese e in Calabria e presenta caratteri somatici e produttivi ben definiti, soprattutto grazie all'opera di selezione svolta. E' una pecora di grande mole, alta e slanciata con una notevole velocità di accrescimento. E' diffusa nelle zone di bassa e media collina, poste ad un'altitudine compresa tra i 200 e i 400 metri sul livello del mare e occorre precisare che tale tipo genetico, in passato, veniva allevato solo in aziende di tipo familiare in numero di 5-10 pecore per azienda e, solo successivamente, si è potuto assistere alla nascita di allevamenti di maggiori dimensioni. In passato prevaleva la transumanza, mentre oggi l'allevamento è di tipo stanziale poderale-familiare e la manodopera utilizzata è generalmente quella della famiglia colonica stessa. L'alimentazione è basata sul pascolo per tutto l'anno; nel periodo invernale, logicamente, si effettua una integrazione con l'utilizzo di fieno di sulla, di lupinella e di erba medica, e di paglia di avena o d'orzo. Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste direzione generale della produzione agricola, con Decreto del 22 Aprile 1987, approva il nuovo standard e le nuove Norme Tecniche della razza Laticauda, nonché il regolamento dei controlli funzionali ed il Regolamento delle Manifestazioni Ufficiali delle razze ovine da carne. La pecora di Laticauda fa parte dell'Arca del Gusto, progetto della Fondazione Slow Food che raccoglie le piccole produzioni di eccellenza gastronomica minacciate dall'agricoltura industriale, dal degrado ambientale, dall'omologazione.

Esiste inoltre una proposta di Disciplinare di Produzione IGP per "Agnello Laticauda" e DOP "Pecorino Laticauda Sannita".

### *Caratteristiche morfologiche e produttive*

*Taglia:* grande.

*Testa:* pesante, profilo montonino più accentuato nel maschio che nella femmina, acorne; orecchie grandi portate in basso e lateralmente.

*Collo:* lungo e robusto nel maschio, lungo e più sottile nella femmina.

*Tronco:* lungo e largo, garrese leggermente tagliente, torace alto e profondo, coste arcuate, groppa larga e spiovente, arti lunghi, coda grassa.

*Vello:* bianco poco serrato, presenza di pelo tipo canino, ricopre il corpo ad esclusione della faccia ventrale del tronco, della regione inferiore del collo, della fronte, guance e arti fino al ginocchio e al garretto.

*Pelle e pigmentazione*: sottile rosea, frequenti macchie nere, marroni o rosse alle palpebre, al musello, alle orecchie e agli arti.

*Altezza media al garrese*:

- Maschi a. cm. 82

- Femmine a. cm. 71

*Peso medio*:

- Maschi a. Kg. 95

- Femmine a. Kg. 69

#### **7.4 Gentile di Puglia**

*Origine e area di allevamento*

Il patrimonio ovino pugliese, a causa delle continue occupazioni e dominazioni straniere susseguitesì nel corso dei secoli, è stato storicamente caratterizzato da greggi promiscui, frutto di incroci fortuiti. Nel Medioevo gli allevatori diedero vita alle prime importazioni di razze straniere, al fine di migliorare le produzioni delle razze ovine autoctone. L'origine della razza ovina Gentile di Puglia (o Merino di Puglia, Pugliese Migliorata, Merino d'Italia, Merino Gentile) è oggetto di animate controversie tra gli storici. L'opinione maggiormente diffusa è che le razze ovine pugliesi fossero, fino all'inizio dell'età moderna, caratterizzate da produzioni di scarso valore. Si attribuisce all'introduzione di arieti *merinos* spagnoli nella seconda metà del Quattrocento il progressivo miglioramento del patrimonio ovino pugliese, fino a quel momento costituito quasi esclusivamente da pecore leccesi. La razza ovina Gentile di Puglia sarebbe quindi frutto di incroci tra pecore locali "Carfagne" di scarso pregio e *merinos* spagnoli. Altobella e Muscio, che hanno condotto approfonditi studi circa la questione dell'origine della razza Gentile di Puglia, sostengono un'ipotesi opposta a quella comunemente diffusa. Essi infatti sottolineano che non esiste alcuna documentazione che attesti importazioni di *merinos* spagnoli in Puglia. Esistono invece fonti documentarie che riportano dell'esistenza, in Puglia di una pecora a lana fina, già prima dell'introduzione di *merinos* spagnoli. Fonti antiche, risalenti all'età romana, descrivevano pecore a lana bianca con un vello assimilabile a quello della razza Gentile, diffuse sul territorio pugliese. Sia Plinio che Varrone dividevano in due classi le pecore pugliesi: le *pellitae* o *tectae*, dal vello bianco e soffice, diffuse da Taranto alla Dauna, e le coloniche, dalla lana irta e pelosa, affini alle pecore mosce o leccesi. Le prime venivano allevate con un sistema stanziale, per

prevenire qualunque inquinamento del bianco manto, mentre le seconde venivano allevate con un sistema brado o transumante. Sono stati rinvenuti alcuni reperti archeologici, nei pressi del fiume Carapelle, che ritraggono pecore con caratteristiche tipiche della razza Gentile di Puglia, risalenti all'epoca degli antichi Dauni. Nella *Naturalis Historia* Plinio descrive le razze ovine presenti in Spagna in età romana, come caratterizzate da lana rossa o nera, ma non vi è cenno a pecore dal vello bianco. Tali pecore sarebbero invece comparse nella penisola iberica dopo il 60 d.C., a seguito di importazioni di arieti provenienti dalla Puglia. Secondo queste e numerose altre testimonianze dell'epoca, la pecora *merina* spagnola sarebbe pertanto derivata da una razza pugliese, e non il contrario. Esistono anche documentazioni storiche che inducono a pensare che la razza Gentile si sia diffusa dalla Puglia verso il nord-Africa e la Spagna, già nel I secolo a.C., ad opera delle invasioni saracene. L'allevamento di questa razza ovina subì una lunga battuta d'arresto nel periodo medioevale, per riprendere intorno al XIII secolo, come fonte di lana pregiata per importanti centri tessili industriali dell'Italia Settentrionale. I capi di bestiame ovino, presenti nel Tavoliere, si ridussero da due milioni alla fine del '500 a seicentomila nel 1635. Il '700, cessato il difficile periodo vicereale spagnolo e subentrato ad esso quello austriaco e poi dei Borbone, fu un secolo di forte crescita economica per la Capitanata e Foggia. Nel 1806, con l'abolizione della Mena delle Pecore di Foggia giunse a termine la lunga storia di questa istituzione. La struttura agraria del territorio venne modificata profondamente, specie per quanto attiene al rapporto pastorizia-agricoltura, a favore di quest'ultima. La pratica della monocoltura cerealicola portò alla distruzione dei pascoli ed alla fine della pastorizia. Il progressivo decadimento che ha caratterizzato, nei secoli a seguire, l'allevamento della razza Gentile nel Tavoliere di Puglia costituisce un problema di ancora difficile analisi. La Gentile di Puglia è una razza a prevalente attitudine alla produzione della lana, anche se attualmente l'orientamento del miglioramento è quello di esaltare l'attitudine alla produzione di carne, includendola quindi tra le razze ovine a duplice attitudine. Oltre alla Puglia, è diffusa anche in Basilicata, Calabria e in altre regioni meridionali.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive della razza*

*Taglia:* media.

*Testa:* profilo leggermente montonino con corna robuste a spirale regolare nei maschi; a profilo rettilineo, con corna poco sviluppate in circa il 10% delle femmine.

*Collo:* corto e robusto nel maschio, più lungo e sottile nella femmina.

*Tronco:* lungo e mediamente largo.

*Arti:* solidi e corti.

*Vello:* bianco, a lana fine, costituito da blocchi prismatici.

*Pelle e pigmentazione:* sottile, rosea a volte presenza di piccole macchie nere o marroni alle orecchie, al musello ed all'occhio.

*Altezza media al garrese:*

- Maschi a. cm. 71

- Femmine a. cm. 62

*Peso medio:*

- Maschi a. Kg. 67

- Femmine a. Kg. 43

*Produzioni medie:*

Carne

- Maschi a. Kg. 45

- Femmine a. Kg. 34

Lana (in sucido)

- Arieti Kg. 6

- Pecore Kg. 3.5

- Latte lt.80/100

(contenuto in grasso 8%-11%)

## **7.5 Leccese**

### *Origine e diffusione*

L'origine della razza ovina Leccese sembrerebbe risalire alla razza asiatica o siriana del Sanson (*Ovis aries asiatica*) e più propriamente alla sottorazza chiamata Zackel dai Tedeschi e Tzourkana dai Rumeni (Pacces et al. 1878, cit. da Ferrante, 1966; Mannarini, 1912, cit. da Visicchio, 1931; De Paolis, 1954). Dalla primitiva ed unica razza si sarebbero originate in seguito due sottorazze: la "Altamurana" (anche detta "Moscia Barese" o "della Murgia"), a vello e faccia completamente bianchi e la "Leccese" (conosciuta anche come "Moscia Leccese" o più semplicemente "Moscia"), a faccia ed arti neri (Jovino, 1930; Visicchio, 1931; Ovile Nazionale di Foggia, 1932). Questa ultima sottorazza, della quale esistono soggetti completamente neri anche nel vello, deriverebbe dalla Moscia primitiva per selezione contro la ipericodermatosi, dermatite da fotosensibilizzazione provocata dalla ingestione di *Hypericum triquetrifolium* Turra o *H. crispum* L. (Montemurro, 1963),

localmente detto “fumolo”. E’ stato infatti osservato che i soggetti con faccia ed arti pigmentati sono relativamente resistenti all’affezione suddetta (Jovino, 1930; Pepe, 1946). La razza Leccese ha una lunga tradizione di allevamento nell’area salentina; selezionatasi nelle aree più povere del Salento, ha visto periodi di particolare attenzione ed espansione per le sue doti di rusticità, ma anche per la buona attitudine alla produzione di latte, che, nei decenni passati, le avevano fatto prendere il sopravvento sull’Altamurana anche nell’area murgiana, malgrado le meno pregevoli qualità della lana. Fino ai primi anni ’80, sia per la sua consistenza, che per l’entità delle sue produzioni, la pecora Leccese rappresentava una delle popolazioni di maggiore interesse del meridione peninsulare d’Italia. L’aumento dei costi di produzione e la riduzione del tornaconto economico degli allevamenti di questa razza, da anni ha spinto gli allevatori a cercare soluzioni che potessero dare maggiori soddisfazioni ai propri bilanci, attraverso le espressioni quantitative della produzione del latte e della carne. L’introduzione per frazioni di sangue di razze alloctone (Bergamasca, Delle Langhe, Frisia) determinò la comparsa di un tipo morfo-funzionale a taglia grande (detto Leccese del Capo o Capuana), ben distinto dalla iniziale pecora Leccese a taglia piccola, poi evolutosi, per i continui meticcamenti, nella Leccese a taglia media che in seguito sostituì entrambe le tipologie precedenti (taglia piccola e grande) delle quali oggi permangono solo alcuni soggetti in pochissimi allevamenti. La scomparsa della pecora a taglia grande è stata provocata principalmente dalla sua minore capacità di adattamento all’ambiente alimentare e nosologico; mentre, rispetto alla taglia originaria, le nuove tipologie (taglia grande e media) garantivano un agnello allo svezzamento di maggior peso, ma anche una più elevata produzione di latte. In alcune zone del Brindisino e della Provincia di Bari (Fasano, Ostuni, Ceglie, Monopoli, Putignano, Gioia del Colle) il miglioramento dell’attitudine alla produzione è stato tentato attraverso l’incrocio della pecora leccese con l’ariete montenegrino, a volte con il bergamasco ma anche con il Gentile di Puglia, portando alla formazione, soprattutto nella zona di Fasano, di una popolazione meticcia che da alcuni era stata considerata razza con nome di fasanese. In seguito, le risposte economiche non soddisfacenti, hanno determinato anche per la pecora Leccese un rapido decadimento demografico dovuto all’introduzione di animali di altre razze di varie provenienze (soprattutto Sarda e Comisana); molti degli allevamenti che hanno conservato una base leccese hanno praticato incroci e meticcamenti con queste razze, provocando una violenta deformazione dell’originale genotipo; e come per la pecora Altamurana, sono state troppo spesso trascurate e sottovalutate le proprietà qualitative del latte, migliori rispetto a quelle delle razze di nuova introduzione. Fino agli anni ’70 la pecora leccese era considerata a

triplice attitudine: latte-carne-lana. La produzione del latte era considerata buona (circa 100-120 litri per capo, di cui 70 circa destinati al caseificio e 40 all'agnello) e la lana consentiva la duplice utilizzazione per tessuti e come lana da materasso. Alla fine degli anni '60, alla razza ovina Leccese vennero attribuite migliori capacità per la produzione del latte (Cianci *et al.*, 1968) e le norme tecniche del 1987 ne prevedono infatti l'orientamento verso questa produzione. Anche molti allevatori della pecora Altamurana utilizzarono arieti leccesi per il miglioramento della attitudine lattifera delle proprie greggi (Bellitti *et al.*, 1970; Bellitti *et al.*, 1974; Montemurro e Cianci, 1976; Celi *et al.*, 1978). Lo standard e le norme tecniche della razza Leccese sono state approvate con D.M. 22 Aprile 1987, che ha recepito modifiche rispetto al D.M. del 1958.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive*

*Taglia:* media, medio-pesante

*Testa:* leggera, allungata, asciutta con profilo montonino, frequenti corna aperte ed a spirale nei maschi; profilo rettilineo ed assenza di corna nelle femmine, orecchie medie e quasi orizzontali, ciuffo di lana corto in fronte.

*Tronco:* lungo, garrese con altezza inferiore alla groppa, fianchi e costati piatti, coda lunga e sottile, mammelle sviluppate, di forma globosa, bene attaccate; arti lunghi e diritti, unghie scuri.

*Vello:* bianco in genere, con varianti a vello nero, aperto ed a blocchi conici con filamenti penduli. Lascia scoperti arti, faccia, gola.

*Pelle e pigmentazione:* rosa nei soggetti a vello bianco, con macchie nere allo sterno, pelo nero raso sulla faccia, arti neri o picchiettati, aperture naturali come il palato nere.

*Altezza media al garrese:*

- Maschi a. cm. 73

- Femmine a. cm. 66

*Peso medio:*

- Maschi a. Kg. 58

- Femmine a. Kg. 45

*Produzioni medie:* (grasso 7% proteine 6,5%)

- Latte lt. 150 - 200 per lattazione

## 7.6 Sarda

### *Origine e diffusione della razza*

Razza autoctona della Sardegna, probabilmente discende dal muflone (*Ovis musimon*), che vive allo stato selvatico sui monti del Gennargentu, o dal grande ceppo siriano (Bonelli P. 1961) dal quale provengono molte altre razze del bacino del Mediterraneo.

In passato, fino agli inizi di questo secolo, vennero tentati incroci (Passino F. 1935) con pecore di altre razze, particolarmente del tipo *merinos*, con lo scopo di aumentare la taglia e migliorare le caratteristiche del vello delle pecore locali. Queste immissioni di sangue non ebbero tuttavia molta fortuna, poichè, essendo tali razze in genere dotate di scarsa attitudine lattifera, con l'incrocio si veniva a deprimere l'attitudine a produrre latte, che il pastore sardo, a giusto titolo, ha sempre ritenuto opportuno salvaguardare ed esaltare nel proprio allevamento. Nei primi anni del secolo, in provincia di Cagliari, vennero inoltre effettuati incroci con arieti di provenienza siciliana, ma di probabile origine maltese. Allo stato attuale non è facile precisare quale importanza abbiano avuto, nella formazione della razza Sarda, questi apporti di sangue dall'esterno, ma si può supporre che una certa influenza vi sia stata, a giudicare dalle differenze morfologiche esistenti nell'ambito della razza (Casu S. 1967).

Tradizionalmente, con riferimento al carattere più evidente, venivano distinte all'interno della razza Sarda, tre differenti tipi o sottorazze: di piccola, di media e di grossa taglia.

Attualmente questa distinzione ha perso molto del suo valore, in quanto gli scambi di riproduttori sono frequenti, e si assiste sempre di più ad una evoluzione che porta all'affermazione in tutta l'Isola della pecora di taglia media, che può essere ormai considerata la vera pecora Sarda e che rappresenta più dell' 80% del totale.

Oltre che nella propria terra di origine, dove conta una popolazione di circa due milioni e mezzo di capi, è allevata in diverse zone della penisola tra cui: il Lazio, la Toscana, l'Umbria, l'Abruzzo e le Marche per quanto riguarda il centro Italia; la Sicilia e la Calabria nel meridione e gruppi meno consistenti nel nord, tra cui i più importanti si trovano in Liguria, Piemonte e in Emilia Romagna. All'estero si registrano nuclei in vari paesi del mediterraneo tra cui la Tunisia e la Spagna. Allo stato attuale gli ovini di tale razza presenti in Italia sono circa 4.000.000 di capi, di cui un buon 60% allevato solo in Sardegna (la pecora sarda costituisce oltre il 50% del patrimonio ovino italiano). Si può quindi descrivere come una razza rustica di taglia medio-piccola (femmine adulte di 40-50 kg e maschi adulti di 80-90 kg) e molto produttiva: viene allevata in modo estensivo e transumante nelle zone di origine, e in modo stanziale con pascolo negli allevamenti continentali. La principale caratteristica per la quale viene allevata è la produzione del latte, che oscilla dai 60 litri in

100 giorni per le primipare in allevamento estensivo, ai 180 litri in 180 giorni per le pluripare in allevamento intensivo. Per quello che riguarda la carne, nonostante la pecora sarda sia ad attitudine lattifera, anche questa produzione ha una sua importanza. Infatti molto richiesta sul mercato è la carne dell'agnello tra gli 8 e i 10 kg di peso, mentre nella sua zona d'origine ha un buon riscontro di mercato anche la carne dei soggetti adulti, impiegata nella preparazione di diversi piatti della tradizione sarda. Infine, la produzione della lana ha un ruolo marginale essendo di qualità grossolana, e quindi adatta per tappeti e materassi.

Ricordiamo inoltre produzioni tipiche di pregio derivanti da questa razza, come il “Pecorino Sardo DOP” e “l’Agnello di Sardegna IGP”. Il Pecorino Sardo DOP è il formaggio ovino tra i più blasonati in Sardegna e vanta tra i suoi antenati tipologie casearie isolate che risalgono alla fine del '700. E' titolare della Denominazione d'Origine dal 1991, prima grande consacrazione per un formaggio tipico particolarmente rappresentativo del panorama sardo, e della Denominazione d'Origine Protetta in ambito europeo dal 1996. L’Agnello di Sardegna IGP è un prodotto dalle caratteristiche peculiari che derivano da un tipo di allevamento tradizionale: l'allattamento e il pascolo naturale sono le condizioni essenziali imposte dal disciplinare per poter fregiare il prodotto della denominazione di origine.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive*

*Taglia:* media.

*Testa:* distinta, profilo diritto; orecchie medio-piccole, mobili, orizzontali; nei maschi a volte corna poco sviluppate.

*Tronco:* allungato, a forma tronco-conica, torace profondo e leggermente piatto, spalle leggere e ben attaccate, dorso dritto, ventre capace ed arrotondato, coda esile e lunga, mammella sferica, larga, ben irrorata, capezzoli ben diretti.

*Vello:* bianco, aperto, biocchi appuntiti; sotto il garretto, metà avambraccio e faccia, fino alla fronte, nudi.

*Pelle e pigmentazione:* sottile, elastica, bianco-rosata.

*Altezza media al garrese:*

- Maschi a. cm. 71

- Femmine a. cm. 63

*Peso medio:*

- Maschi a. Kg. 59

- Femmine a. Kg. 42

*Produzioni medie:* Latte (senza poppata - grasso 6,0% proteine 5,3%)



- primipare lt. 130
- pluripare lt. 180

Carne:

- Maschi Kg. 44,5
- Femmine Kg. 32,5

Lana: (in sucido)

- Arieti Kg. 2,5
  - Pecore Kg. 1,2
- 

## **7.7 Comisana**

### *Storia e diffusione della razza*

La pecora Comisana (o Lentinese, Testa rossa, Faccia rossa) deriva il suo nome da Comiso, comune del ragusano, dove in passato se ne svolgeva il più importante mercato. La sua area di espansione iniziale comprendente la Sicilia litoranea, collinare e sub-montana, si è rapidamente allargata grazie alla capacità di acclimatamento di questa razza che si è diffusa anche in ampie zone della Penisola, soprattutto centrale dove, tenuta in buone condizioni di alimentazione ed allevamento, sta dimostrando elevate capacità produttive. I suoi antenati sono da ricercarsi nelle razze ovine dell'Asia orientale e dell'Africa settentrionale. Gli incroci tra tali popolazioni e le razze ovine autoctone sono avvenuti tra il IX e il X secolo, quando la Sicilia era un fiorente centro di scambi commerciali tra il Mediterraneo e l'Oriente. La razza Comisana venne selezionata agli inizi del XX secolo nelle province di Siracusa e Ragusa, attraverso incroci di sostituzione tra pecore autoctone siciliane e arieti provenienti da Malta e dal nord Africa, dal caratteristico colore rosso della testa. Il sangue maltese ha sensibilmente migliorato le pecore Siciliane, specialmente quelle che venivano allevate sul versante orientale, esaltandone le produzioni lattifere. Infatti, il continuo meticciamiento con la popolazione locale ha determinato la fissazione di caratteri con particolare esaltazione della produzione di latte. La nuova razza Comisana ha infatti conservato la rusticità e l'adattamento all'ambiente della pecora Siciliana, acquisendo le capacità produttive delle razze importate. Quando durante il XX secolo alcuni allevatori isolani emigrarono verso il centro e il nord d'Italia portando con sé le loro greggi, la razza Comisana cominciò a

diffondersi fuori dalla Sicilia, nelle regioni Toscana, Lazio, Abruzzo, Basilicata, Puglia, Calabria, Lombardia e Piemonte dove oggi si registra un'importante presenza della razza.

La sua consistenza numerica supera i 750.000 capi, di cui più del 50% allevato in Sicilia, ed è in aumento per la sua elevata attitudine lattifera, che consente alle pecore pluripare di superare, talvolta ampiamente, i 150 kg di latte per lattazione, con una buona resa in formaggio, unitamente a una soddisfacente produzione di carne, assicurata soprattutto da un elevato tasso di gemellarità (60-70%), mentre la lana è piuttosto grossolana e viene usata per materassi. La Comisana è considerata una tra le più importanti e pregiate razze ovine del Mediterraneo: viene allevata principalmente per la produzione di latte destinato alla trasformazione in formaggi tipici di alto pregio, prodotti artigianalmente secondo una tradizione millenaria. La pecora Comisana costituisce una risorsa preziosa per le aree interne collinari e montuose dell'Italia centro-meridionale e della Sicilia, dove le difficili condizioni pedo-climatiche e socio-economiche impediscono molto spesso attività produttive alternative. In tali zone, a causa delle lunghe estati calde e secche, la produzione foraggera è concentrata nella stagione invernale e in quella primaverile, cosa che limita fortemente le produzioni zootecniche. Nonostante tali condizioni ambientali, l'allevamento di ovini comisani è capace di assicurare una produzione lattiero-casearia di grande valore, basata sull'utilizzo delle risorse naturali locali. L'allevamento è esercitato in piccoli e grandi greggi e con forme che vanno dal brado e semibrado alla completa stabulazione, dimostrando le sue doti di adattamento ai vari tipi di allevamento, nei quali, ovviamente, il livello produttivo è diverso. Pur essendo allevata con sistemi tipicamente estensivi o semi-estensivi, la pecora Comisana si adatta bene anche a sistemi di allevamento più intensivi tecnologicamente evoluti, con stabulazione semi-libera, allattamento artificiale degli agnelli, mungitura meccanica e alimentazione nazionalizzata che fa uso di concentrati, determinando la completa espressione dei caratteri raggiungendo ottimi livelli produttivi.

L'allevamento di una razza ovina autoctona come la Comisana costituisce un esempio brillante di agricoltura sostenibile ed eco-compatibile. In Sicilia il sistema di allevamento ovino è di tipo semi-brado: è contraddistinto da uno scarso impiego di capitali e si basa prevalentemente sull'utilizzo delle risorse naturali esistenti.

La pecora Comisana è allevata per la sua ottima produzione di latte destinato alla trasformazione in formaggi tipici di alto pregio: la produzione di latte varia dai 120 ai 200 lt per lattazione, ma in alcune aziende vi sono soggetti di pregio che producono più di 2 lt al

giorno. Il latte di pecora Comisana ha un'elevata resa alla caseificazione, e presenta una percentuale media di grasso del 6.5% e di proteina del 5.2%. Tutta la produzione di latte della pecora Comisana, a eccezione della parte utilizzata dagli agnelli, viene destinata alla trasformazione. Dalla caseificazione del latte di pecora si ottengono numerosi prodotti pregiati, legati alle tradizioni rurali siciliane, il principale dei quali è il formaggio Pecorino. L'indirizzo di miglioramento è l'esaltazione dell'attitudine lattifera, della prolificità e l'aumento della taglia.

#### *Caratteristiche morfologiche e produttive*

Vi è una notevole variabilità di caratteri morfologici e produttivi nell'ambito della vasta popolazione riconducibile alla razza Comisana. Il Regolamento del Libro Genealogico definisce i requisiti morfologici, genealogici e funzionali tipici della razza.

*Taglia:* medio-grande

*Testa:* color miele rossastro, leggera e acorne in entrambi i sessi, grande e lunga, profilo montonino; orecchie lunghe, larghe e cadenti.

*Tronco:* lungo, petto largo e prominente, torace largo, dorso diritto, lombi lunghi e robusti. Ventre voluminoso arti lunghi e robusti; Mammelle grandi, voluminose e ben attaccate.

*Vello:* bianco, esteso, escluso basso ventre e tarso inferiore agli arti è di tipo semi-chiuso o semi-aperto; biocchi cilindro-conici.

*Pelle e pigmentazione:* rosea, untuosa, unghielli chiari; le regioni non coperte dal vello (parte del collo, ventre, petto, faccia interna delle cosce, arti) sono normalmente di colore bianco e presentano a volte pezzature rosse o marroni.

*Altezza media al garrese:*

- Maschi a. cm. 80

- Femmine a. cm. 70

*Peso medio:*

- Maschi a Kg. 80

- Femmine a. Kg. 50

*Produzioni medie:*

Latte: 150 - 200 kg per lattazione

Carne:

- Maschi a. Kg. 75

- Femmine a. Kg. 68

- Lana: (in sucido)
  - Arieti Kg. 5
  - Pecore Kg. 4
- 

## **8 Campionamento**

A partire dalle informazioni raccolte attraverso le indagini aziendali e i dati provenienti dal Libro Genealogico, è stato individuato, per ognuna delle razze oggetto della ricerca, un campione costituito da soggetti non imparentati tra loro almeno fino alla terza generazione, assortito in modo da assicurare la maggiore rappresentatività sul territorio di ciascuna realtà genetica. Sono stati campionati 2 ml di sangue periferico in provette contenenti l'anticoagulante EDTA, prelevati da più allevamenti, rappresentativi dell'intera area di allevamento di ogni razza oggetto di studio.

Al fine di effettuare le analisi di tracciabilità genetica sui prodotti, che comunemente si trovano realmente in commercio in periodi stagionali di massima richiesta del mercato, sono stati campionati in date diverse, campioni biologici di DNA di soggetti prodotti di incrocio, provenienti da zone di vendita diverse, suddivisi in 4 gruppi:

- Capi d'importazione n°20 soggetti;
- Agnelli Trimeticci; n°30 soggetti;
- Guazzabuglio n°20 soggetti;
- Merinizzate n°20 soggetti,

per un totale di 90 soggetti.

Riepilogo n° soggetti Analizzati per razza			
Razza	Bagnolese	N° soggetti Analizzati	100
Razza	Laticauda	N° soggetti Analizzati	100
Razza	Comisana	N° soggetti Analizzati	96
Razza	Sarda	N° soggetti Analizzati	99
Razza	Gentile di Puglia	N° soggetti Analizzati	108
Razza	Altamurana	N° soggetti Analizzati	114
Razza	Leccese	N° soggetti Analizzati	122
Razza	Capi importazione; Agnelli Trimeticci; Guazzabuglio; Merinizzate	N° soggetti Analizzati	90

## 9 Analisi a loci microsatelliti

### 9.1 Estrazione del DNA

Il sangue prelevato è stato conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione del DNA mediante utilizzo del kit GenElute Blood Genomic Dna Kit Minipreps (Sigma-Aldrich).

#### 9.1.1 Quantificazione del DNA

La concentrazione del DNA è stata determinata misurando l'assorbanza, alla lunghezza d'onda di 260 nm, dell'acido nucleico in una soluzione acquosa rispetto ad una soluzione di riferimento denominata "bianco". L'analisi è stata effettuata all'interno di uno spettrofotometro (GENEQUANT *pro*, Amersham Pharmacia).

Un'assorbanza di 1 OD è approssimativamente equivalente ad una concentrazione di 50µg/ml (coefficiente di estinzione molare) secondo la formula:

$$c \text{ ( } \mu\text{g/ } \mu\text{l)} = (\text{OD}_{260} \times \text{df} \times \text{ec}) / 1000$$

dove  $OD_{260}$  è la densità ottica a 260nm,  $df$  è il fattore di diluizione ed  $ec$  è il coefficiente di estinzione, equivalente a 50 µg/ml. Il rapporto  $A_{260}/A_{280}$  è utilizzato per stimare la purezza dell'acido nucleico. Il DNA puro ha un valore approssimativamente di 1.8; valori tendenti a 2 indicano la presenza di RNA nel campione, valori inferiori a 1.8 rivelano invece la presenza di proteine (assorbanza a 280nm).

## 9.2 La scelta del panel dei marcatori microsatelliti

Per quanto riguarda lo studio della biodiversità, della variabilità e di genetica di popolazione in generale, la FAO ha proposto delle linee guida che selezionano un set di microsatelliti informativi, allo scopo di dare uniformità alle ricerche dei vari gruppi di lavoro che si occupano dell'argomento. Per l'analisi della variabilità genetica e la caratterizzazione delle popolazioni sono stati suggeriti 19 marcatori microsatellite: tali marcatori sono stati selezionati dal panel proposto dalla Commissione ISAG/FAO per la "Measurement of Domestic Animal Diversity" (2004). Per ognuno di essi sono state elaborate delle reazioni teoriche di amplificazione in multiplex e considerate eventuali sostituzioni, sulla base delle valutazioni e delle informazioni ottenute dalle banche Genomiche Internazionali.

Marker	Chr	Primer sequences (5' - 3')*	Reference
OarHH35	4	AATTGCATTCAGTATCTTTAACATCTGGC ATGAAAATATAAAGAGAATGAACCACACGG	Henry et al. (1993)
OarHH41	10	TCCACAGGCTTAAATCTATATAGCAACC CCAGCTAAAGATAAAAGATGATGTGGGAG	Henry et al. (1993)
OarHH47	18	TTTATTGACAACTCTCTTCTAACTCCACC GTAGTTATTTAAAAAATATCATACCTCTTAAGG	Henry et al. (1993)
OarHH64	4	CGTTCCTCACTATGGAAAGTTATATATGC CACTCTATTGTAAGAATTTGAATGAGAGC	Henry et al. (1993)
OarJMP29	24	GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC GAAGTGGCAAGATTCAGAGGGGAAG	Penty et al. (in prep.)
OarJMP8	6	CGGGATGATCTTCTGTCCAAATATGC CATTTGCTTTGGCTTCAGAACCAGAG	Penty et al. (in prep.)
OarVH72	25	CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG	Pierson et al. (1993)
OMHC1	20	ATCTGGTGGGCTACAGTCCATG GCAATGCTTTCTAAATTCTGAGGAA	Groth & Wetherall (1994)
RM4*	15	CAGCAAAATATCAGCAAACCT CCACCTGGGAAGGCCTTTA	Kossarek et al. (1993)
TGLA137*/**	5	GTTGACTTGTTAATCACTGACAGCC CCTTAGACACACGTGAAGTCCAC	Georges & Massey (1992)

\* Bovine microsatellite

**Figura 2: I marker suggeriti dalla FAO/ISAG per le pecore**

Marker	Chr	Primer sequences (5' - 3')*	Reference
BM1314*	22	TTCCTCCTCTTCTCTCCAAAC ATCTCAAACGCCAGTGTGG	Bishop et al. (1994)
BM6506*	1	GCACGTGGTAAAGAGATGGC AGCAACTTGAGCATGGCAC	Bishop et al. (1994)
BM6526*	26	CATGCCAAACAATATCCAGC TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	Bishop et al. (1994)
BM757*	9	TGGAAACAATGTAAACCTGGG TTGAGCCACCAAGGAACC	Bishop et al. (1994)
BM8125*	17	CTCTATCTGTGAAAAGGTGGG GGGGGTTAGACTTCAACATACG	Bishop et al. (1994)
BM827*	3	GGGCTGGTCGTATGCTGAG GTTGGAATTGCTGAAGTGACC	Bishop et al. (1994)
CSSM31*	23	CCAAGTTTAGTACTTGTAAGTAGA GACTCTCTAGCACTTTATCTGTGT	Moore et al. (1994)
CSSM47*	2	TCTCTGTCTCTATCACTATATGGC CTGGGCACCTGAACTATCATCAT	Moore et al. (1994)
HUJ616*	13	TTCAAACACACATTGACAGGG GGACCTTTGGCAATGGAAGG	Barendse et al. (1994)
ILSTS002*	14	TCTATACACATGTGCTGTGC CTTAGGGGTGAAGTGACACG	Kemp et al. (1992)
OarAE129	5	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATATTTTCAACACC	Penty et al. (1993)
OarCP20	21	GATCCCCTGGAGGAGGAAACGG GGCATTTTCATGGCTTTAGCAGG	Ede et al. (1994a)
OarCP34	3	GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	Ede et al. (1994b)
OarCP38	10	CAACTTTGGTGCATATTCAGGTTGC GCAGTCGCAGCAGGCTGAAGAGG	Ede et al. (1994b)
OarFCB128	2	CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG ATTAAAGCATCTTCTCTTTATTTCTCGC	Buchanan & Crawford (1993)
OarFCB20	2	AAATGTGTTTAAGATTCCATACA GTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	Buchanan et al (1994)
OarFCB48	17	GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	Buchanan et al. (1994)

**Figura 2: I marker suggeriti dalla FAO/ISAG per le pecore**



Di seguito l'elenco dei marcatori STR scelti: per convenzione si è scelto di marcare con il fluorocromo specifico i Primers Forward per ciascun microsatellite.

<u>BM1824</u>	<i>Primer F</i>	GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC	FAM	Chr 1
	<i>Primer R</i>	CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG		
<u>BM8125</u>	<i>Primer F</i>	CTC TAT CTG TGG AAA AGG TGG G	NED	Chr17
	<i>Primer R</i>	GGG GGT TAG ACT TCA ACA TAC G		
<u>ILSTS11</u>	<i>Primer F</i>	GCT TGC TAC ATG GAA AGT GC	FAM	Chr9
	<i>Primer R</i>	CTA AAA TGC AGA GCC CTA CC		
<u>ILSTS5</u>	<i>Primer F</i>	GGA AGC AAT GAA ATC TAT AGC C	NED	Chr7
	<i>Primer R</i>	TGT TCT GTG AGT TTG TAA GC		
<u>ILSTS28</u>	<i>Primer F</i>	TCC AGA TTT TGT ACC AGA CC	NED	Chr3
	<i>Primer R</i>	GTC ATG TCA TAC CTT TGA GC		
<u>INRA063</u>	<i>Primer F</i>	ATT TGC ACA AGC TAA ATC TAA CC	FAM	Chr14
	<i>Primer R</i>	AAA CCA CAG AAA TGC TTG GAA G		
<u>MAF214</u>	<i>Primer F</i>	GGG TGA TCT TAG GGA GGT TTT GGA GG	HEX	Chr16
	<i>Primer R</i>	AAT GCA GGA GAT CTG AGG CAG GGA CG		
<u>MAF65</u>	<i>Primer F</i>	AAA GGC CAG AGT ATG CAA TTA GGA G	FAM	Chr15
	<i>Primer R</i>	CCA CTC CTC CTG AGA ATA TAA CAT G		
<u>MAF70</u>	<i>Primer F</i>	CAC GGA GTC ACA AAG AGT CAG ACC	HEX	Chr4
	<i>Primer R</i>	GCA GGA CTC TAC GGG GCC TTT GC		
<u>MAF209</u>	<i>Primer F</i>	GAT CAC AAA AAG TTG GAT ACA ACC GTG G	NED	Chr17
	<i>Primer R</i>	TCA TGC ACT TAA GTA TGT AGG ATG CTG		
<u>MAF33</u>	<i>Primer F</i>	GAT CTT TGT TTC AAT CTA TTC CAA TTT C	HEX	Chr9
	<i>Primer R</i>	GAT CAT CTG AGT GTG AGT ATA TAC AG		
<u>MCM140</u>	<i>Primer F</i>	GTT CGT ACT TCT GGG TAC TGG TCT C	FAM	Chr6
	<i>Primer R</i>	GTC CAT GGA TTT GCA GAG TCA G		
<u>OarAE129</u>	<i>Primer F</i>	AAT CCA GTG TGT GAA AGA CTA ATC CAG	NED	Chr5
	<i>Primer R</i>	GTA GAT CAA GAT ATA GAA TAT TTT TCA ACA CC		
<u>OarJMP29</u>	<i>Primer F</i>	GTA TAC ACG TGG ACA CCG CTT TGT AC	NED	Chr24
	<i>Primer R</i>	GAA GTG GCA AGA TTC AGA GGG GAA G		
<u>OarFCB128</u>	<i>Primer F</i>	ATT AAA GCA TCT TCT CTT TAT TTC CTC GC	FAM	Chr2
	<i>Primer R</i>	CAG CTG AGC AAC TAA GAC ATA CAT GCG		
<u>OarFCB193</u>	<i>Primer F</i>	TTC ATC TCA GAC TGG GAT TCA GAA AGG C	FAM	Chr11
	<i>Primer R</i>	GCT TGG AAA TAA CCC TCC TGC ATC CC		
<u>OarFCB304</u>	<i>Primer F</i>	CCC TAG GAG CTT TCA ATA AAG AAT CGG	NED	Chr19
	<i>Primer R</i>	CGC TGC TGT CAA CTG GGT CAG GG		
<u>OarJMP58</u>	<i>Primer F</i>	GAA GTC ATT GAG GGG TCG CTA ACC	HEX	Chr26
	<i>Primer R</i>	CTT CAT GTT CAC AGG ACT TTC TCT G		
<u>OarVH72</u>	<i>Primer F</i>	GGC CTC TCA AGG GGC AAG AGC AGG	FAM	Chr25
	<i>Primer R</i>	CTC TAG AGG ATC TGG AAT GCA AAG CTC		



I primers per l'analisi dei microsatelliti sono stati forniti dall'Applied Biosystems in forma liofilizzata e per un quantitativo complessivo di 80 pmoli; ciascun primer è stato risospeso e diluito in H<sub>2</sub>O ad una concentrazione finale di 100 µM (800 µl di H<sub>2</sub>O). Da ogni stock di Primer (100 µM) è stata successivamente effettuata la diluizione finale di lavoro pari a 10 µM. Dato che la marcatura con diversi fluorocromi consente di analizzare fino a tre frammenti sovrapposti e che, mediante sequenziatore automatico ABI Prism 310, è possibile separare frammenti, la cui lunghezza copra un range da circa 50 a circa 500 paia di basi, è stato possibile ottimizzare 5 multiplex, in grado di coprire l'intervallo di taglie alleliche citato, senza dar luogo a sovrapposizioni all'interno dello stesso tipo di fluorocromo. Le concentrazioni di tutti i campioni sono state riconterollate allo spettrofotometro e diluite a 4 ng/µl per poter poi essere processati con le 5 Multiplex PCR.

<u>MULTIPLEX 1</u>		
OarFCB128	96-130	FAM
ILSTS11	256-294	FAM
OarAE129	133-159	NED
ILSTS5	174-218	NED

<u>MULTIPLEX 4</u>		
MAF65	123-127	FAM
INRA063	163-199	FAM
OarJMP29	96-150	NED
OarJMP58	145-169	HEX

<u>MULTIPLEX 2</u>		
OarVH72	121-145	FAM
ILSTS28	105-177	NED
MAF214	174-282	HEX

<u>MULTIPLEX 3</u>		
BM8125	110-130	NED
MCM140	167-193	FAM
MAF33	121-141	HEX

<u>MULTIPLEX 5</u>		
OarFCB193	96-136	FAM
OarFCB304	150-188	NED
MAF70	124-166	HEX
BM1824	180-192	FAM
MAF209	109-135	NED

Figura 3: Le 5 multiplex PCR ottimizzate

### *9.2.1 Amplificazione mediante PCR*

L'analisi dei marcatori microsatelliti è stata condotta mediante multiplex-PCR utilizzando il kit commerciale Multiplex PCR Kit (Cat. N° 206143, QIAGEN); le reazioni di amplificazione in multiplex per un volume finale pari a 10 µl ciascuna sono costituite da 6,25µl di PCR Master Mix fornita dalla ditta, 0,1µl di ogni primer ed acqua fino ad un volume finale di 9µl, a cui verrà aggiunto 1 µl di DNA.

Il profilo di amplificazione ha previsto un ciclo di pre-denaturazione a 95°C per 15 minuti seguito da 35 cicli alle seguenti condizioni:

95°C per 30 secondi,

58°C per 90 secondi,

72°C per 60 secondi,

l'amplificazione è stata completata da un'elongazione finale di 30 minuti a 60°C.

Tali condizioni si sono rivelate ottimali per tutte le 5 reazioni di multiplex-PCR.

### *9.2.2 Separazione degli amplificati mediante elettroforesi capillare*

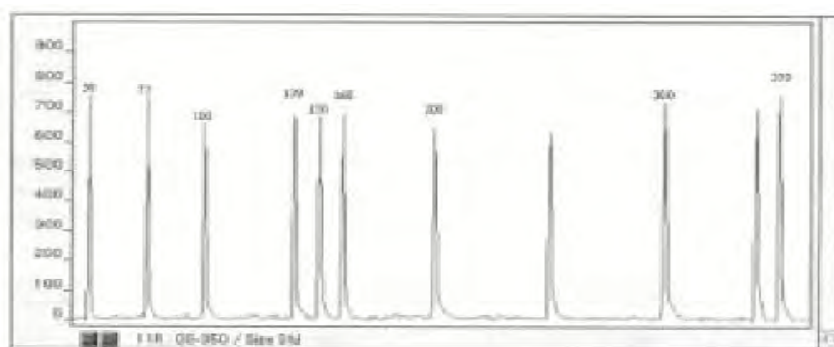
Una quantità di amplificato tra 0.6-1µl è stata preparata in provette da 0.5ml con 13µl di formammide denaturante e 0.5µl di standard di corsa ROX 350 o 500 (Applied Biosystems) costituito da frammenti di DNA di taglia nota. I campioni sono stati denaturati per 3 minuti a 95°C e caricati all'interno del sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Lo strumento sottopone il campione ad elettroforesi capillare e attraverso un fascio laser accoppiato ad un sistema ottico, acquisisce il segnale di fluorescenza del frammento marcato e dello standard di corsa. Un computer dotato di software dedicati (Genescan v2.1 e GenMapper v4.0, Applied Biosystems), elabora il dato grezzo e restituisce la taglia del frammento oggetto di studio. Il tempo di durata di ciascuna corsa è stato esteso a 28 minuti per permettere a tutti i frammenti di essere analizzati.

Per ogni campione, sono state ottenute le taglie alleliche dei 19 marcatori analizzati: questo dato molecolare è stato sottoposto all'analisi statistica relativa ai parametri di genetica di popolazione.

### 9.2.3 Analisi degli elettroferogrammi

In seguito alla corsa su sequenziatore automatico i dati sono stati analizzati mediante software dedicati. In particolare, il dato grezzo è stato inizialmente elaborato con il software Genescan v2.1, che interpreta il segnale fluorescente e stabilisce la taglia del frammento incognito in base ad uno standard di corsa (ROX, fig.4).



**Figura 4: Picchi dello standard ROX 350 discriminati all'interno del sequenziatore automatico**

Il dato è stato poi analizzato con il software GeneMapper v4.0, che permette di isolare i profili dei singoli marcatori e di confrontare i diversi soggetti. Ogni animale è stato associato a 38 valori corrispondenti alle coppie alleliche per i 19 loci analizzati.

Di seguito si riportano in figura 4b gli elettroferogrammi prodotti dal sequenziatore automatico, con i picchi allelici per tutte e 5 le multiplex utilizzate.

**Figura 4b: Elettroferogrammi delle 5 multiplex prodotti dal sequenziatore automatico**

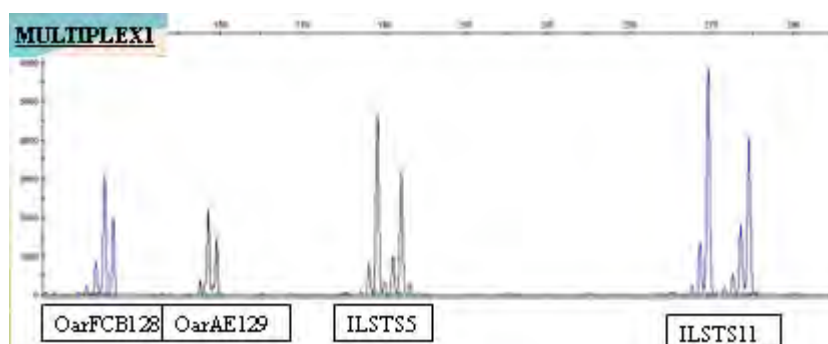
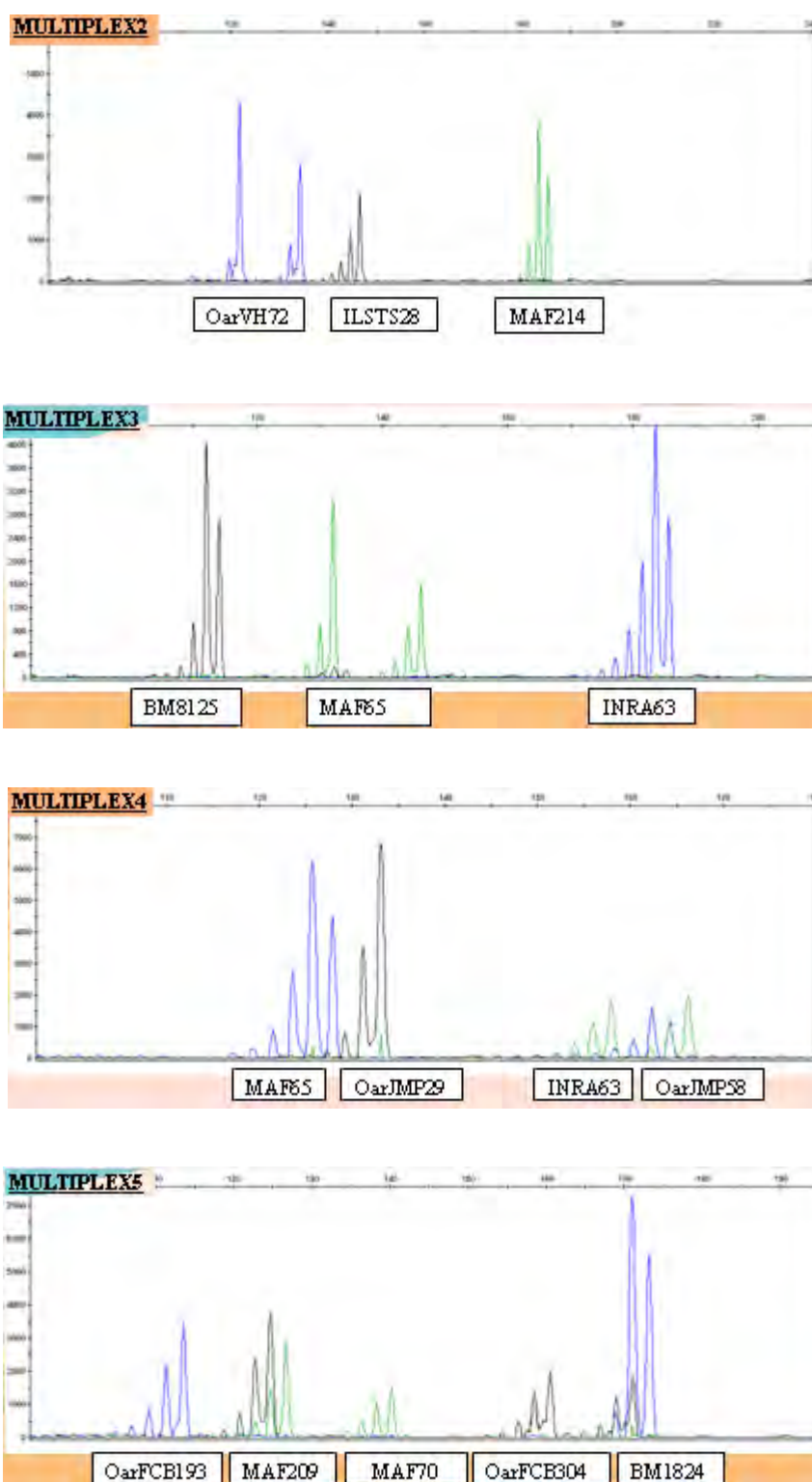


Figura 4b: Elettroferogrammi delle 5 multiplex prodotti dal sequenziatore automatico



Al fine di poter effettuare la tracciabilità razziale dei prodotti carnei mediante il metodo probabilistico, basato sull'impiego di marcatori Microsatelliti, si rende necessaria una nomenclatura uniforme del dato molecolare corrispondente ai picchi allelici che definiscono sia il genotipo di ogni soggetto appartenente a ciascuna delle razze oggetto della ricerca, sia il genotipo di ogni soggetto appartenente a ciascuno dei 4 gruppi di confronto. Per tutti i capi analizzati e costituenti il database di partenza per tutte le analisi di genetica di popolazione e di tracciabilità razziale oggetto di questa ricerca è stata effettuata la Categorizzazione del dato Grezzo.

## 10 La Categorizzazione

Per poter calcolare le frequenze alleliche all'interno di una popolazione, ma soprattutto fra popolazioni è necessaria una "nomenclatura" uniforme dei marcatori STR utilizzati. Tale nomenclatura è ancor più utile quando vengono comparati dati provenienti da diversi laboratori che possono utilizzare strumentazioni diverse per l'analisi dello stesso panel di microsatelliti.

### 10.1 Fase 1: Stima dei range allelici

La prima fase di questa elaborazione è quella di analizzare ogni singolo marcatore all'interno di ciascuna razza. Si procede con il calcolo dei valori massimi e minimi relativi ai dati ottenuti mediante l'analizzatore di sequenze ed il confronto con il range allelico presente in letteratura. Di seguito viene riportata la tabella relativa a tale analisi.

#### Range allelici ottenuti per ogni PCR multiplex

<b>Letteratura</b>		<b>OarFCB128</b>		<b>ILSTS11</b>		<b>OarAE129</b>		<b>ILSTS5</b>	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Letteratura</b>		<b>99</b>	<b>131</b>	<b>269</b>	<b>285</b>	<b>133</b>	<b>159</b>	<b>186</b>	<b>214</b>
<b>Bagnolese</b>		96,92	125,66	268,04	285	130,76	164,47	184,15	216,68
<b>Laticauda</b>		95,4	125,75	268,04	285,28	134,12	164,72	184,53	216,31
<b>Comisana</b>		95,96	125,77	253,43	293,88	133,82	150,26	184,2	207,59
<b>Sarda</b>		96,09	125,75	268,06	284,27	133,82	163,6	182,58	201,58
<b>Gentile di Puglia</b>		96,15	127,1	267,52	299,44	122,73	162,87	185,07	207,57
<b>Altamurana</b>		108,5	127,06	261,85	286,2	134,15	159,88	184,12	205,12
<b>Leccese</b>		95,33	130,33	263,57	286,08	134,5	161,8	183,62	203,93
<b>Capi di importazione</b>		95,94	123,51	269,96	283,89	133,82	164,91	184,17	199,6
<b>Agnelli trimeticci</b>		95,96	125,77	269,98	284,49	133,82	163,8	184,61	203,38
<b>Guazzabuglio</b>		95,96	125,26	269,78	283,68	133,82	162,66	184,32	199,31
<b>Merinizzate</b>		96,31	125,18	269,94	283,93	133,66	150,11	184,17	213,85

		OarVH72		ILSTS28		MAF214	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Letteratura</b>		<b>121</b>	<b>135</b>	<b>130</b>	<b>171</b>	<b>182</b>	<b>230</b>
<b>Bagnolese</b>		120,08	136,71	124,24	173,52	176,79	254,55
<b>Laticauda</b>		114,25	135,11	124,59	171,33	169,65	252,74
<b>Comisana</b>		116,89	137,46	122,41	169,45	177,92	260,75
<b>Sarda</b>		119,39	139,53	107,71	167,84	178,28	258,58
<b>Gentile di Puglia</b>		119,24	138,2	124,36	168,5	165,14	259,63
<b>Altamurana</b>		119,06	138,39	124,57	166,56	183,05	254,56
<b>Leccese</b>		114,14	156,59	112,21	168,41	162,69	255,28
<b>Capi di importazione</b>		119,96	134,91	124,4	177,46	178,04	258,11
<b>Agnelli trimeticci</b>		118,19	133,33	109,28	166,01	178,2	257,07
<b>Guazzabuglio</b>		121,18	135,22	124,5	163,89	178,07	249,23
<b>Merinizzate</b>		122,91	135,7	124,53	167,43	178,02	270,41

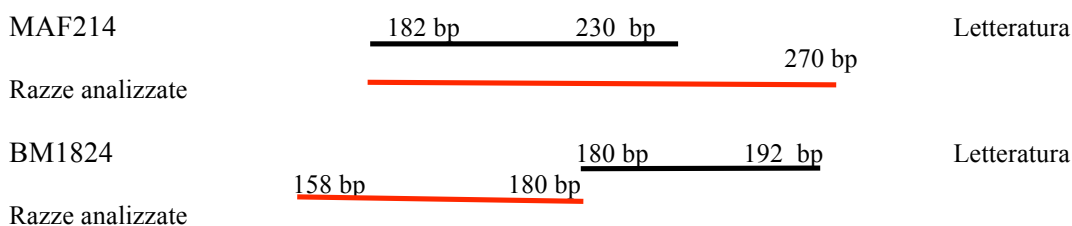
		BM8125		MCM140		MAF33	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Letteratura</b>		<b>112</b>	<b>122</b>	<b>167</b>	<b>193</b>	<b>121</b>	<b>141</b>
<b>Bagnolese</b>		100,11	120,78	161,04	193,55	118,42	141,77
<b>Laticauda</b>		104,54	121,47	170,21	193,53	118,64	139,23
<b>Comisana</b>		104,29	118,04	161,51	194,4	116,93	143,52
<b>Sarda</b>		107,94	117,8	171,39	192,17	117,05	138,18
<b>Gentile di Puglia</b>		104,03	118,99	170,41	193,29	119,27	142,08
<b>Altamurana</b>		102,27	118,59	164,23	190,99	116,33	148,09
<b>Leccese</b>		103,99	120,31	163,98	193,94	112	143,91
<b>Capi di importazione</b>		108,47	118,09	173,37	196,69	119,24	141,69
<b>Agnelli trimeticci</b>		100,23	119,74	177,8	190,34	118,96	141,76
<b>Guazzabuglio</b>		108,01	117,64	171,2	187,69	118,88	141,74
<b>Merinizzate</b>		102,48	117,71	171,31	189,93	118,64	141,7

Tabella 4: Multiplex 4		MAF65		INRA063		OarJMP29		OarJMP58	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Letteratura</b>		<b>123</b>	<b>135</b>	<b>165</b>	<b>199</b>	<b>96</b>	<b>150</b>	<b>133</b>	<b>169</b>
<b>Bagnolese</b>		120,49	137,6	155,63	198,29	111,17	151,65	138,88	173,3
<b>Laticauda</b>		118,46	139,73	155,33	190,68	111,03	151,42	140,08	167,79
<b>Comisana</b>		118,4	141,81	157,33	192,82	112,26	155,53	138,11	167,87
<b>Sarda</b>		120,64	144,29	155,46	192,9	111,15	145,27	140,05	165,97
<b>Gentile di Puglia</b>		121,72	140,77	155,07	190,96	111,23	154,91	125,63	167,76
<b>Altamurana</b>		120,97	136,62	156,49	196,95	112,07	155	128,66	165,95
<b>Leccese</b>		121,42	140,31	155,48	194,54	111,44	143,3	126,3	169,01
<b>Capi di importazione</b>		118,8	135,7	157,95	192,8	113,39	142,99	138,25	165,94
<b>Agnelli trimeticci</b>		122,9	137,51	157,52	192,77	112,84	155,68	138,17	165,66
<b>Guazzabuglio</b>		124,58	137,33	155,52	190,23	111,3	155,4	138,17	167,42
<b>Merinizzate</b>		122,48	135,29	155,24	184,45	112,72	155,24	138,04	165,2

Tabella 5: Multiplex 5		OarFCB193		OarFCB304		MAF70		BM1824		MAF209	
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max
<b>Letteratura</b>		<b>96</b>	<b>136</b>	<b>150</b>	<b>188</b>	<b>124</b>	<b>166</b>	<b>180</b>	<b>192</b>	<b>109</b>	<b>135</b>
<b>Bagnolese</b>		98	134,51	158,12	188,05	129,89	159,66	167,35	174,45	100	128,23
<b>Laticauda</b>		100,72	136,81	150,24	189,78	130,02	167,01	167,59	174,51	103,93	130,11
<b>Comisana</b>		100,75	120,35	160,41	189,94	120,92	156,74	167,25	188,49	102,87	131,89
<b>Sarda</b>		105,45	134,53	163,65	188,72	130,03	152,71	167,66	174,52	103,44	146,43
<b>Gentile di Puglia</b>		100,17	122,74	160,68	189,67	126,53	158,85	167,07	174,99	102,06	130,81
<b>Altamurana</b>		100,38	116,33	152,62	187,65	122,05	158,85	166,37	176,82	101,73	131,01
<b>Leccese</b>		100,38	118,13	146,22	189,97	121,36	158,61	163,7	179,84	102,57	147,91
<b>Capi di importazione</b>		94,88	122,26	161,51	189,09	126,04	148,52	168,33	174,86	103,69	126,57
<b>Agnelli trimeticci</b>		94,34	125,97	155,25	186,79	127,78	156,76	159,66	174,66	100	129,99
<b>Guazzabuglio</b>		100,75	129,93	161,39	191,15	133,57	156,64	167,39	173,77	103,13	126,07
<b>Merinizzate</b>		96,29	121,69	148,72	187,64	129,68	154,43	167,83	174,33	112,4	130,03



Come si può osservare dai grafici, per soli due marcatori la differenza tra il range allelico presente in letteratura e quello riscontrato in ogni razza oggetto dello studio, è rilevante. Tali marcatori microsatellite sono il **MAF214** e il **BM1824**. Nel caso del primo marcatore la differenza riscontrata è di circa 40 bp rispetto al valore superiore. Nel secondo caso, ciò che si evidenzia è che per tutte le razze analizzate, tranne che per la Comisana, il valore maggiore del range allelico corrisponde a quello inferiore del range presente in letteratura.



Tale discrepanza viene considerata ai fini della categorizzazione allelica.

## 10.2 Fase 2: Codifica allelica

La seconda fase della categorizzazione consiste nella codifica allelica. Per ogni singolo marcatore e per ogni razza, si costruisce un grafico a partire dai dati grezzi ottenuti mediante corsa elettroforetica, raccolti dal software ABI Prism310 Collection v.3.1.0 attraverso l'elettroferogramma per tutti gli alleli riscontrati ed elaborati dal software Gene Mapper v.4.0; successivamente si procede nella suddivisione in precise categorie alleliche.

Questa fase consiste nel riportare il genotipo del singolo campione oggetto di analisi ai genotipi categorizzati contenuti in database. Il database è attualmente composto da 9 razze ovine, testate nel corso degli anni attraverso progetti di ricerca per gli stessi marcatori impiegati in questa tesi ed è quindi costituito da dati categorizzati. Il database costituisce un punto di riferimento fondamentale per l'interpretazione di tutti i dati scaturiti dalle analisi effettuate in questo progetto di ricerca.

In rapporto al database si calcola, laddove se ne presenti la necessità, un fattore di correzione del dato grezzo da applicare per ogni marcatore e per ogni razza, affinché tutti i campioni possano rientrare nelle fasce alleliche di ciascun marcatore.

La metodica per la standardizzazione della designazione allelica prevede l'utilizzo, per ogni PCR multiplex ed in ogni corsa elettroforetica, di un marker di taglia allelica. Tale marker è costituito da uno o più campioni, appartenenti alla specie ovina, presentanti un genotipo eterozigote noti provenienti dal database e quindi precedentemente categorizzati. Il marker

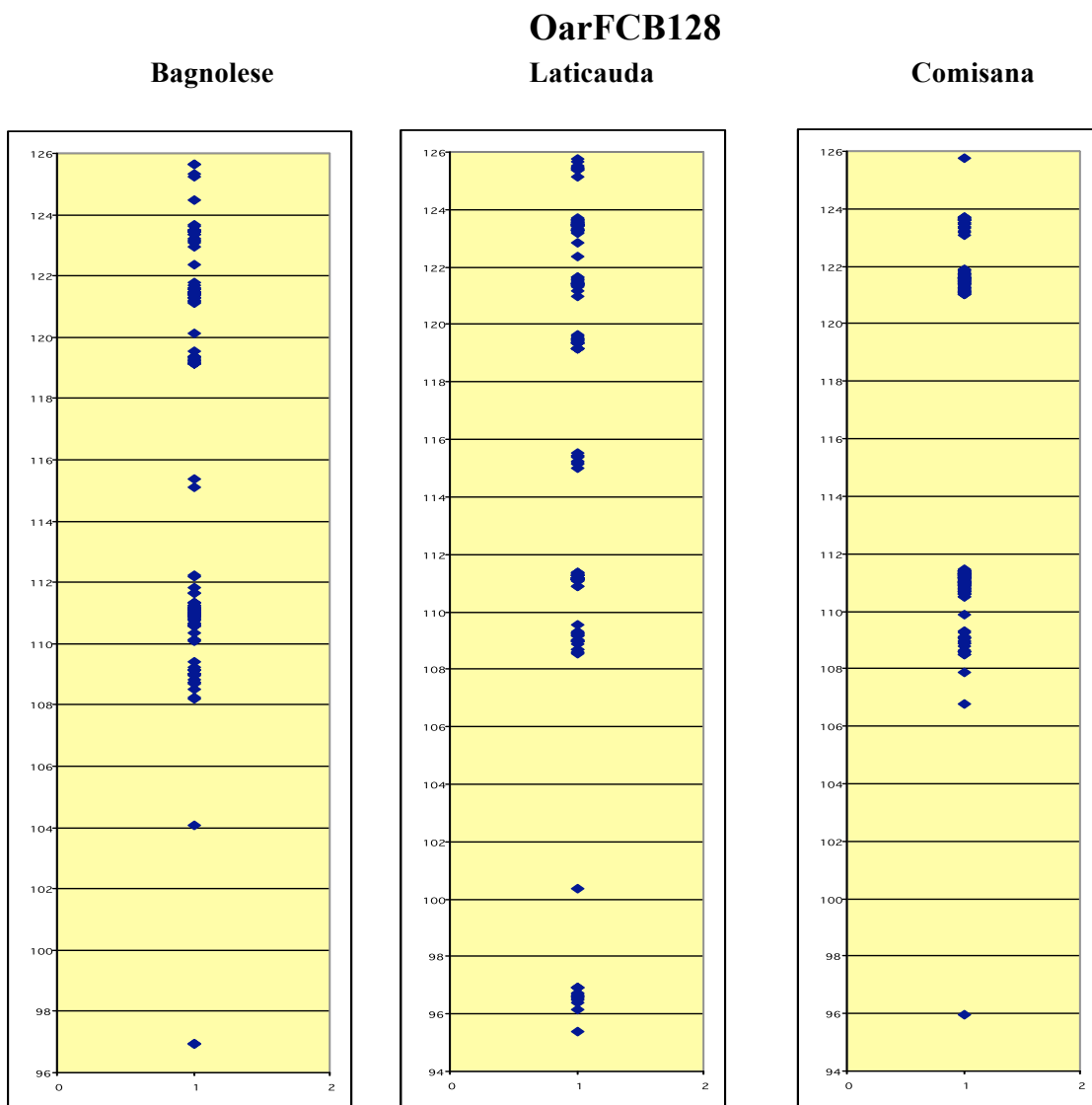
viene utilizzato come punto di ancoraggio con il database categorizzato ai fini della designazione allelica e costituisce un controllo positivo. Per ogni razza allo studio ogni schema evidenzia il taglio allelico rappresentato in categorie discrete ai cui margini viene riportato il valore soglia attribuito a ciascuna fascia allelica.

All'interno di ciascuna fascia allelica si collocano, gli alleli relativi al genotipo di ciascun animale oggetto di studio (rappresentati nel grafico da piccoli quadrati blu).

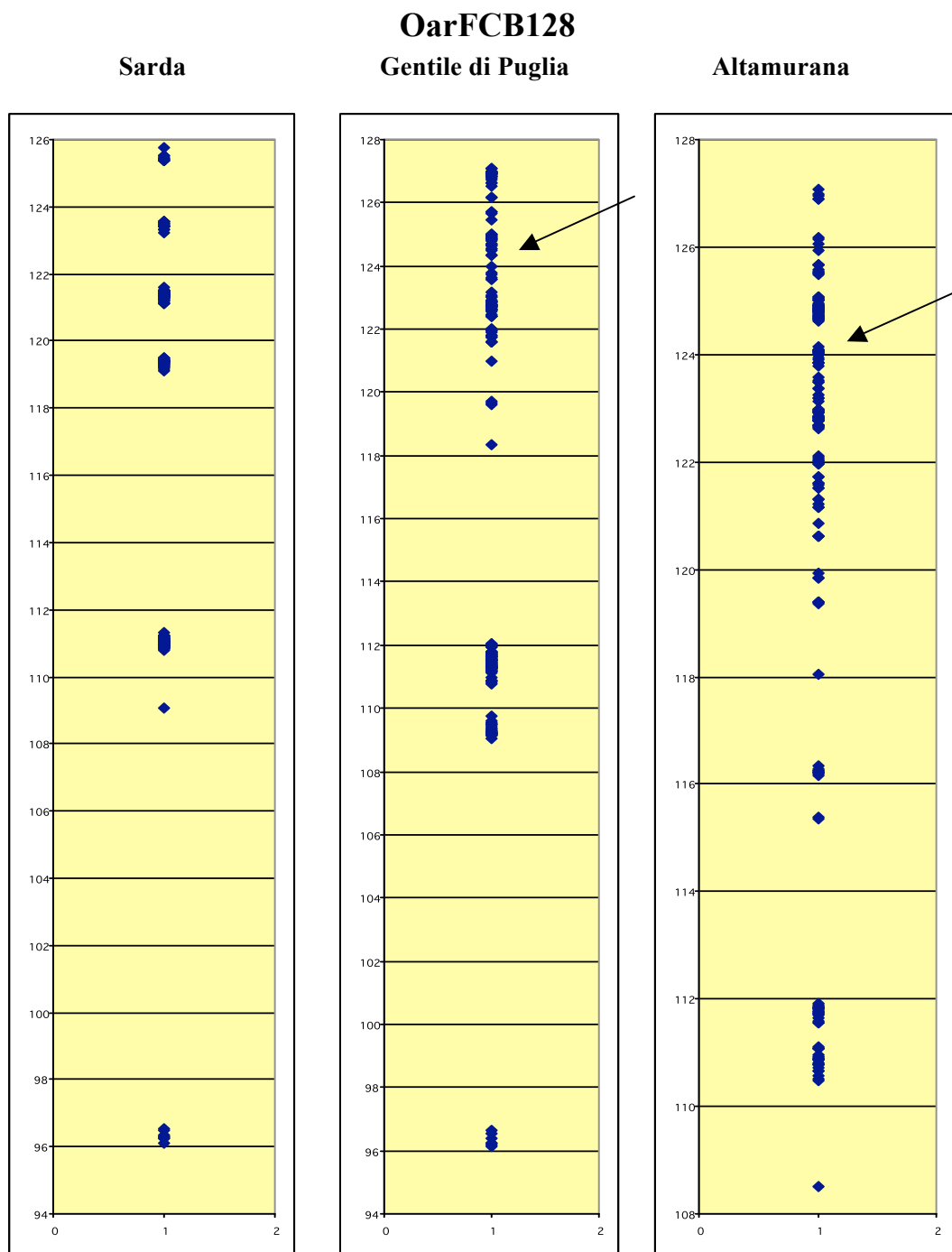
Per i genotipi facilmente interpretabili, ciascun allele è contenuto perfettamente all'interno dei limiti della fascia allelica di appartenenza.

Come si può osservare dai grafici che seguono, il microsatellite OarFCB128, per molte delle razze allo studio, non presenta particolari difficoltà interpretative, risultando ben categorizzabile.

**Grafico 1**



Sempre per il marcatore OarFCB128, alcuni alleli appartenenti a soggetti delle razze Leccese, Gentile di Puglia e Altamurana, hanno costituito l'oggetto di una più complessa analisi per l'attribuzione della taglia allelica. Come viene illustrato dai grafici che seguono ed indicato dalle frecce, il genotipo di diversi soggetti si è trovato fisicamente posizionato sul margine del taglio allelico esistente tra una categoria allelica e l'altra, rendendo difficile il taglio e di conseguenza l'attribuzione ad una categoria allelica in corrispondenza delle varie categorie alleliche predefinite.

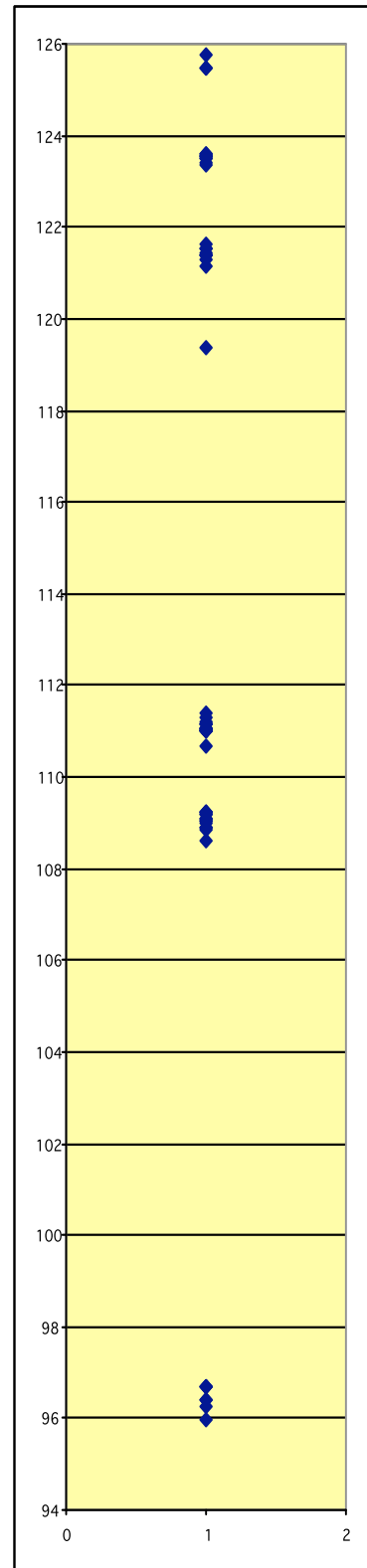
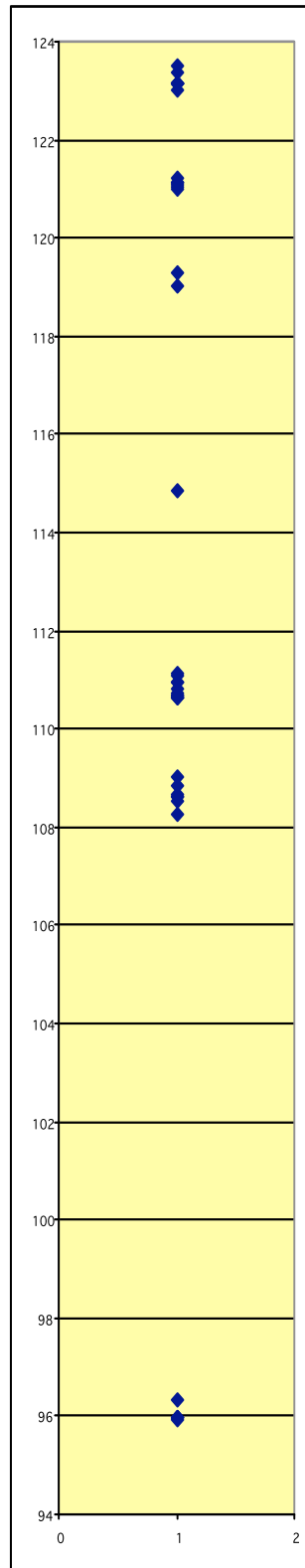
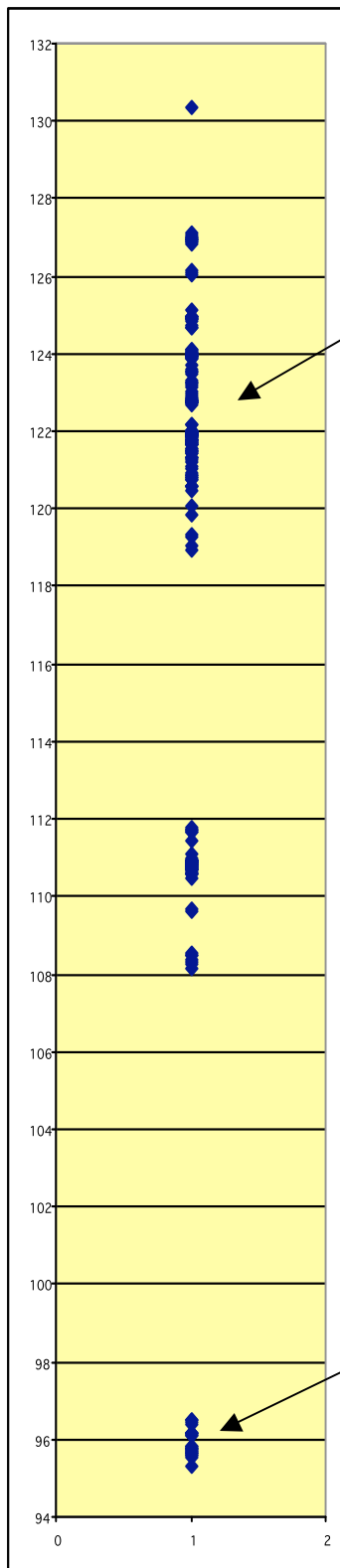


# OarFCB128

Leccese

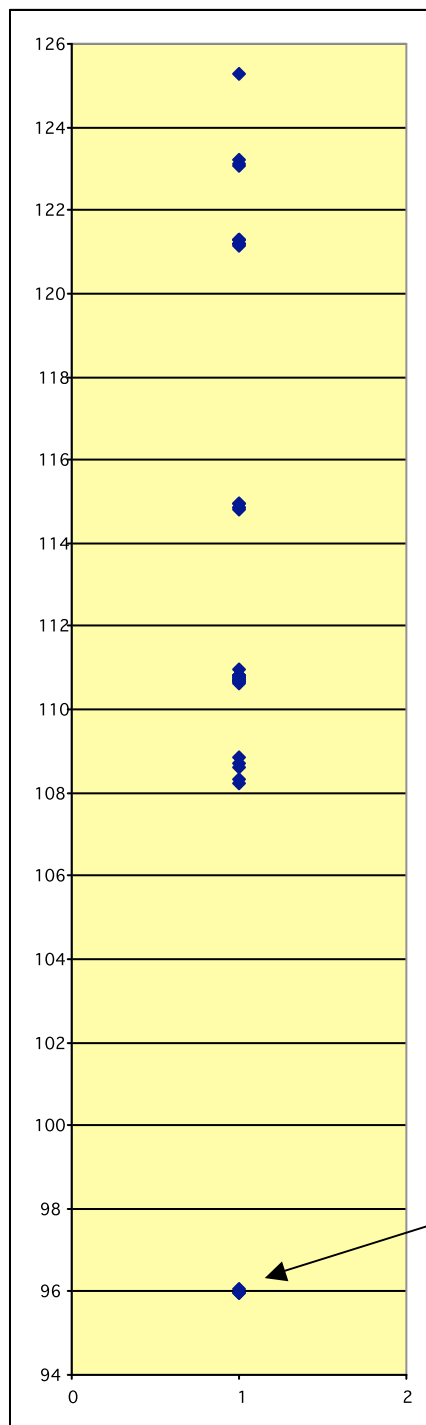
Capi d'importazione

Agnelli trimeticci

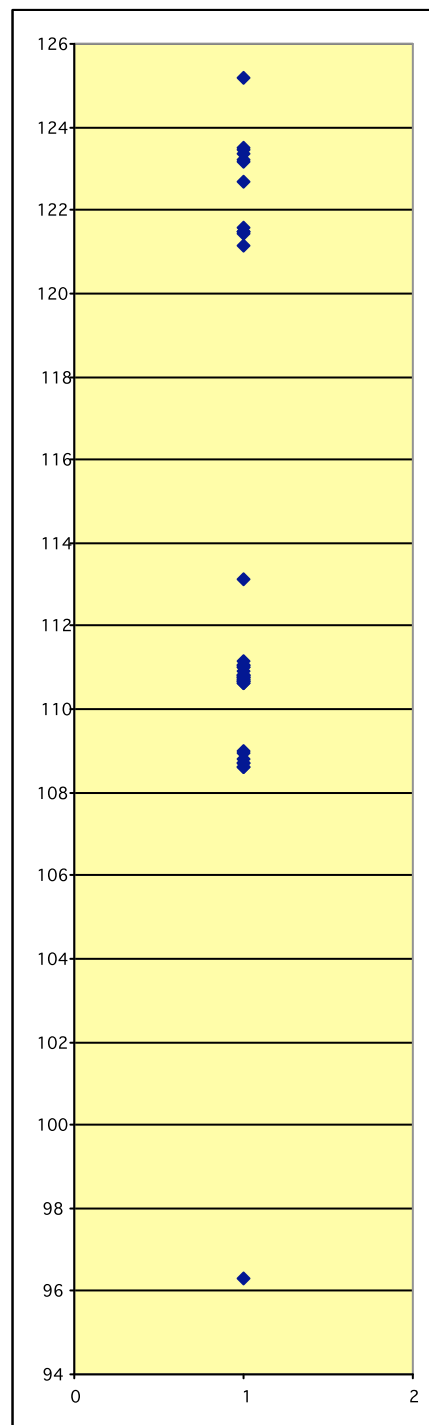


## OarFCB128

Guazzabuglio



Merinizzate



Questa situazione si verifica piuttosto frequentemente e del tutto casualmente anche per altri marcatori, indipendentemente dalle razze oggetto di studio.

La maggior parte dei marcatori microsatellite analizzati non presentano problemi interpretativi e di standardizzazione; tali problemi invece si riscontrano per due loci appartenenti alla multiplex 1 (STS11 e STS5), tre loci della PCR multiplex 2 (VH72, STS28 MAF214), un locus della multiplex 3 (MCM140), 4 loci della multiplex 4 (MAF65, INRA063, JMP29 e JMP58), 2 loci della multiplex 5 (FCB304 e BM1824). Nei casi sopra segnalati, diversi campioni presentano un dato molecolare avente valori ai limite della categorizzazione (valori “borderline”) per i quali sussistono difficoltà interpretative nella designazione del range allelico.

Al fine di assegnare correttamente la taglia allelica di tali genotipi, risulta di fondamentale importanza il procedimento della categorizzazione allelica, secondo i seguenti step:

1. Viene ripreso in esame il dato grezzo relativo al genotipo di ogni singolo soggetto
2. Vengono rivalutati i parametri relativi alla corsa elettroforetica
3. Viene rianalizzato il dato grezzo prodotto dal sequenziatore, a partire dal file raw data
4. Viene rivalutato lo stato di omozigosi o di eterozigosi.

### *10.3 Fase 3: Calcolo ed applicazione del “fattore di allineamento”*

La terza fase della procedura di categorizzazione consiste nell’impiego di un “fattore di allineamento” del dato grezzo da applicare per ogni marcatore e per ogni razza (tabella 6). In questo modo, viene calcolato l’eventuale slittamento della categoria allelica riscontrabile da un confronto con il database categorizzato. Questa fase è indispensabile affinché tutti i campioni possano rientrare nelle fasce alleliche di ciascun marcatore. Tutti i fattori di correzione riportati sono stati applicati a ciascuna razza e successivamente è stato ricostruito il grafico generale per ogni singolo marcatore comprendente tutte le razze analizzate, come riportato di seguito (grafico 2). Da questo momento possono essere reimposti i margini delimitanti le diverse categorie alleliche. I tagli operati per la definizione dei diversi alleli sono stati effettuati rispettando un range di operatività compreso tra 1,7 e 2,3 bp, anche se in alcuni casi, evidenziati in rosso nelle tabelle 7-11, tale range è stato adattato all’esigenze dell’analisi.

Laddove si presentino dei campioni “borderline”, attraverso questo procedimento, verrà loro attribuita l’esatta collocazione allelica.

**Tabella 6**

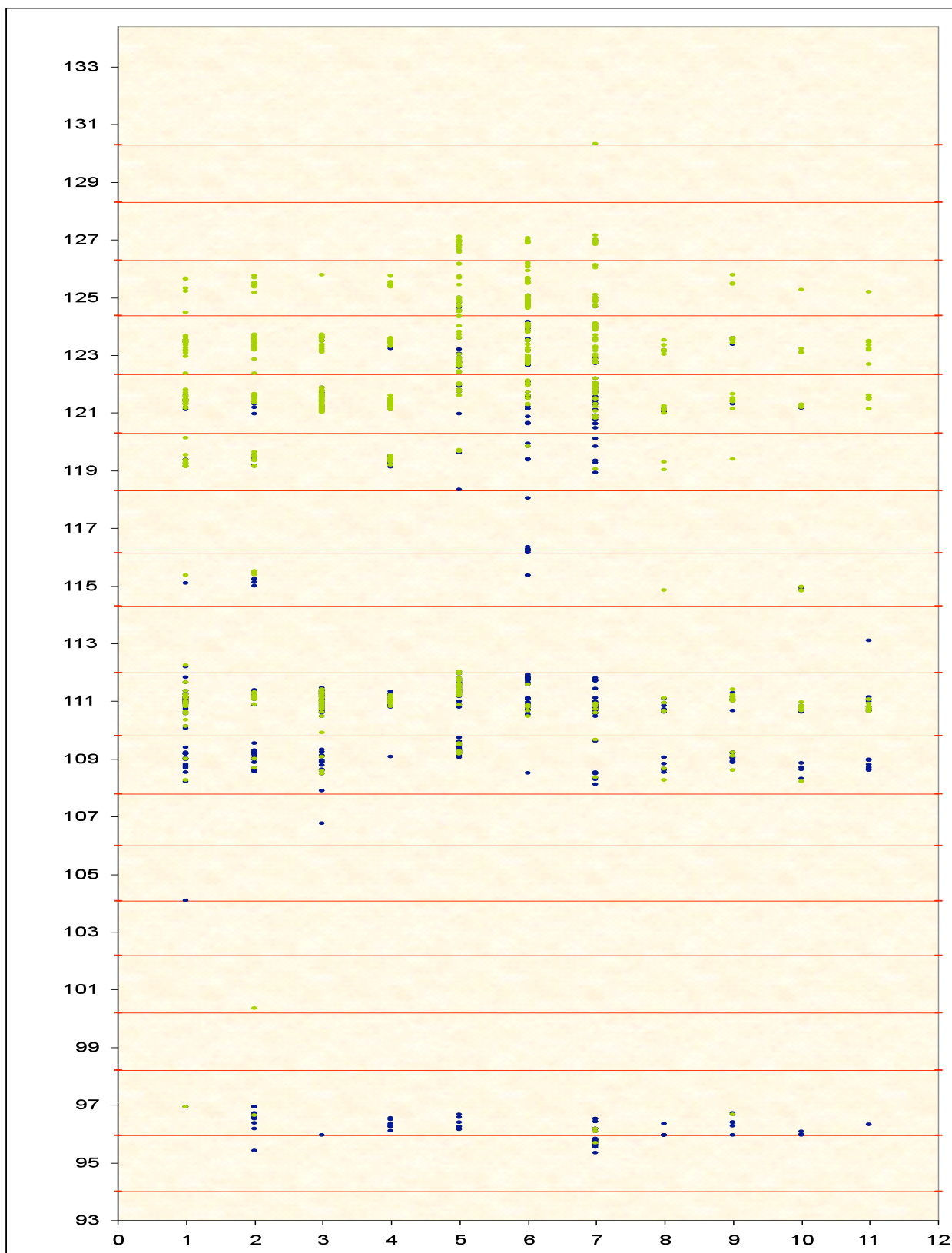
	STS11	STS5	STS28	MAF214	MCM140
Bagnolese	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Laticauda	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Comisana	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Sarda	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Gentile di Puglia	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Altamura	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Leccese	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Capi di importazione	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Agnelli trimeticci	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Guazzabuglio	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6
Merinizzate	-1	+ 0,1	-0,15	-0,1	-0,6

	MAF65	INRA063	JMP29	JMP58	FCB304	BM1824
Bagnolese	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Laticauda	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Comisana	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Sarda	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Gentile di Puglia	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Altamura	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Leccese	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Capi di importazione	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Agnelli trimeticci	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Guazzabuglio	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1
Merinizzate	-0,6	-0,5	-0,6	-0,3	+ 0,1	-0,1

A tutti i marcatori non presenti in tabella 6 non è stato applicato nessun fattore di correzione, in quanto non hanno presentato particolari problemi interpretativi.

**Grafico 2**

**OarFCB128**



1. Bagnolese, 2. Laticauda, 3. Comisana, 4. Sarda, 5. Gentile di Puglia, 6. Altamura, 7. Leccese, 8. Capi di importazione, 9. Agnelli trimeticci, 10. Guazzabuglio, 11. Merinizzate



#### 10.4 Fase 4: Attribuzione allelica

La quarta fase consiste nell'attribuzione allelica finale. Operando sbarramenti allelici definitivi per ogni marcatore, i margini di ciascun allele definiscono la precisa fascia di attribuzione allelica, all'interno della quale si situano in maniera definitiva i genotipi di tutti i campioni appartenenti alle razze oggetto di studio.

Vengono riportati di seguito nelle tabelle 7-11 tutti gli alleli individuati per tutte le razze, ai quali è stata definita la nomenclatura numerica di 1, 2, 3.....partendo dall'amplificato con il minor numero di pb.

In giallo sono riportati gli alleli vuoti ovvero quelli in cui per tutte le razze non è stato trovato il dato.

**Tabella 7**

FCB128				ILSTS11				AE129				ILSTS55			
Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.
1	95,3	97,3	2		251,9				121,8			1	183,6	186	2,4
2	97,3	99,3	2		253,9			1	122,4	124,3	1,9	2	186	187,7	1,7
3	99,3	101,4	2,1		255,9			2	124,3	126,2	1,9	3	187,7	189,5	1,8
4	101,4	103,5	2,1		257,9			3	126,2	128,1	1,9	4	189,5	191,6	2,1
5	103,5	105,6	2,1		259,9			4	128,1	130	1,9	5	191,6	193,62	2,02
6	105,6	107,7	2,1		261,9			5	130	132	2	6	193,6	195,22	1,6
7	107,7	109,8	2,1		263,9			6	132	133,9	1,9	7	195,2	197	1,78
8	109,8	112,1	2,3		265,9	267,9	2	7	133,9	136,1	2,2	8	197	198,65	1,65
9	112,1	113,9	1,8	1	267,9	270,1	2,2	8	136,1	138,2	2,1	9	198,7	200,35	1,7
10	113,9	115,9	2	2	270,1	272	1,9	9	138,2	140,3	2,1	10	200,4	202,3	1,95
11	115,9	117,7	1,8	3	272	273,9	1,9	10	140,3	142,4	2,1	11	202,3	204,2	1,9
12	117,7	119,6	1,9	4	273,9	276,2	2,3	11	142,4	144,4	2	12	204,2	206,1	1,9
13	119,6	121,4	1,8	5	276,2	278	1,8	12	144,4	146,4	2	13	206,1	208	1,9
14	121,4	123,4	2	6	278	280,1	2,05	13	146,4	148,6	2,15	14	208	210	2
15	123,4	125,4	2	7	280,1	282	1,95	14	148,6	150,5	1,9	15	210	212	2
16	125,4	127,4	2	8	282	284,2	2,2	15	150,5	152,5	2	16	212	214	2
17	127,4	129,4	2	9	284,2	286,2	2	16	152,4	154,4	2	17	214	216,2	2,2
18	129,4	131,4	2	10				17	154,4	156,5	2,1				
19	131,4	133,4	2					18	156,5	158,6	2,1				
								19	158,6	160,7	2,1				
								20	160,7	162,9	2,2				
								21	162,9	164,9	2				

**Tabella 8**

VH72				ILSTS28				MAF214			
Categorie	MIN	MAX	Diff	Categorie	MIN	MAX	Diff	Categorie	MIN	MAX	Diff
1	114	116	2	1	124,1	126,36	2,26	1	162,0	164,0	2,0
2	116	118	2	2	126,36	128,3	1,94	2	164,0	166,0	2,0
3	118	120	2	3	128,3	130,3	2	3	166,0	168,0	2,0
4	120	121,9	1,9	4	130,3	132,3	2	4	168,0	170,0	2,0
5	121,9	123,9	2	5	132,3	134,3	2	5	170,0	172,0	2,0
6	123,9	125,9	2	6	134,3	136,3	2	6	172,0	174,1	2,1
7	125,9	127,86	2	7	136,3	138,3	2	7	174,1	176,2	2,1
8	127,86	130,18	2,3	8	138,3	140,3	2	8	176,2	178,3	2,1
9	130,18	132,1	1,9	9	140,3	142,3	2	9	178,3	180,3	2,0
10	132,1	133,79	1,7	10	142,3	144,3	2	10	180,3	182,3	2,0
11	133,79	135,45	1,7	11	144,3	146,15	1,85	11	182,3	184,3	2,0
12	135,45	137,4	2	12	146,15	148,15	2	12	184,3	186,3	2,0
13	137,4	139,7	2,3	13	148,15	150,3	2,15	13	186,3	188,3	2,0
14	139,7	141,9	2,2	14	150,3	152,35	2,05	14	188,3	190,2	1,9
15	141,9	143,9	2	15	152,35	154,3	1,95	15	190,2	192,1	1,9
16	143,9	145,9	2	16	154,3	156,3	2	16	192,1	194,0	1,9
17	145,9	147,9	2	17	156,3	158,3	2	17	194,0	196,0	2,0
18	147,9	149,9	2	18	158,3	160,2	1,9	18	196,0	198,0	2,0
19	149,9	151,9	2	19	160,2	162,2	2	19	198,0	200,0	2,0
20	151,9	153,9	2	20	162,2	164,2	2	20	200,0	202,0	2,0
21	153,9	155,9	2	21	164,2	166,2	2	21	202,0	204,0	2,0
22	155,9	157,9	2	22	166,2	168,2	2	22	204,0	206,0	2,0
				23	168,2	170,2	2	23	206,0	208,0	2,0
				24	170,2	172,2	2	24	208,0	210,0	2,0
				25	172,2	174,2	2	25	210,0	212,0	2,0
				26	174,2	176,2	2	26	212,0	214,0	2,0
								27	214,0	216,0	2,0
								28	216,0	218,0	2,0
								29	218,0	220,0	2,0
								30	220,0	222,0	2,0
								31	222,0	224,0	2,0
								32	224,0	226,0	2,0
								33	226,0	228,0	2,0
								34	228,0	230,0	2,0
								35	230,0	232,0	2,0
								36	232,0	234,0	2,0
								37	234,0	236,0	2,0
								38	236,0	238,0	2,0
								39	238,0	240,0	2,0
								40	240,0	242,0	2,0
								41	242,0	244,0	2,0
								42	244,0	246,0	2,0
								43	246,0	248,0	2,0
								44	248,0	250,0	2,0
								45	250,0	251,9	1,9
								46	251,9	253,8	1,9
								47	253,8	255,8	2,0

**Tabella 9**

BM8125				MCM140				MAF33			
Categorie	MIN	MAX	Diff	Categorie	MIN	MAX	Diff	Categorie	MIN	MAX	Diff
1	101	103	2	1	160	162	2	1	110,5	112,5	2
2	103	105	2	2	162	163,9	1,9	2	112,5	114,5	2
3	105	107	2	3	163,9	165,9	2	3	114,5	116,5	2
4	107	109	2	4	165,9	168	2,1	4	116,5	118,5	2
5	109	111	2	5	167,9	170	2,1	5	118,5	120,5	2
6	111	113	2	6	170	172	2	6	120,5	122,5	2
7	113	115	2	7	172	174	2	7	122,5	124,5	2
8	115	117	2	8	174	176	2	8	124,5	126,5	2
9	117	119	2	9	176	178	2	9	126,5	128,5	2
10	119	121	2	10	178	179,9	1,9	10	128,5	130,5	2
				11	179,9	182	2,1	11	130,5	132,5	2
				12	182	184	2	12	132,5	134,5	2
				13	184	186	2	13	134,5	136,6	2,05
				14	186	188	2	14	136,6	138,5	1,95
				15	188	190,1	2,05	15	138,5	140,5	2
				16	190,1	192,2	2,15	16	140,5	142,5	2
				17	192,2	194	1,8	17	142,5	144,5	2
				18	194	196	2	18	144,5	146,5	2
								19	146,5	148,5	2

**Tabella 10**

MAF65				INRA63				JMP29				JMP58			
Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.	Categorie	MIN	MAX	Diff.
1	121	123	2	1	154	156	2	1	109,0	111,0	2,0	1	123,6	125,6	2
2	123	125	2	2	156	158	2	2	111,0	113,0	2,0	2	125,6	127,8	2,2
3	125	127	2	3	158	160	2	3	113,0	115,0	2,0	3	127,8	129,8	2
4	127	129	2	4	160	162	2	4	115,0	117,0	2,0	4	129,8	131,7	1,9
5	129	131	2	5	162	164	2	5	117,0	119,0	2,0	5	131,7	133,7	2,04
6	131	133	2	6	164	166	2	6	119,0	121,0	2,0	6	133,7	135,9	2,16
7	133	135	2	7	166	168	2	7	121,0	123,0	2,0	7	135,9	138,1	2,2
8	135	137	2	8	168	170	2	8	123,0	125,0	2,0	8	138,1	140,1	2
9	137	139	2	9	170	172	2	9	125,0	127,0	2,0	9	140,1	142,0	1,9
10	139	141	2	10	172	174	2	10	127,0	129,0	2,0	10	142,0	143,9	1,9
				11	174	176	2	11	129,0	131,0	2,0	11	143,9	145,6	1,7
				12	176	178	2	12	131,0	133,0	2,0	12	145,6	147,6	2
				13	178	180	2	13	133,0	135,0	2,0	13	147,6	149,5	1,9
				14	180	182	2	14	135,0	137,0	2,1	14	149,5	151,6	2,1
				15	182	184	2	15	137,0	139,0	2,0	15	151,6	153,6	2
				16	184	186	2	16	139,0	141,0	2,0	16	153,6	155,6	2
				17	186	187,9	1,9	17	141,0	142,9	1,9	17	155,6	157,6	2
				18	187,9	189,8	1,9	18	142,9	145,0	2,1	18	157,6	159,8	2,2
				19	189,8	192	2,2	19	145,0	147,0	2,0	19	159,8	161,8	2
				20	192	194	2	20	147,0	149,0	2,0	20	161,8	163,8	2
				21	194	196	2	21	149,0	151,0	2,0	21	163,8	165,8	2
				22	196	198	2	22	151,0	153,0	2,0	22	165,8	167,8	2
								23	153,0	155,1	2,1	22	167,8	169,8	2
								24	155,1	157,0	1,9	22	169,8	171,8	2
								25	157,0	159,0	2,0				

**Tabella 11**

FCB193				FCB304				MAF70				BM1824				MAF209			
Categoria	MIN	MAX	D.iff.	Categorie	MIN	MAX	D.iff.	Categorie	MIN	MAX	D.iff.	Categorie	MIN	MAX	D.iff.	Categorie	MIN	MAX	D.iff.
1	100,1	102,3	2,2	1	145,1	147,1	2	1	121,2	123,4	2,2	1	162,2	164,2	2	1	99,7	101,7	2
2	102,3	104,4	2,1	2	147,1	149,1	2	2	123,4	125,2	1,8	2	164,2	166,2	2	2	102	103,6	1,85
3	104,4	106,5	2,1	3	149,1	151,1	2	3	125,2	127,2	2	3	166,2	168,2	2	3	104	105,7	2,15
4	106,5	108,5	2	4	151,1	153,1	2	4	127,2	129,2	2	4	168,2	170,1	1,9	4	106	107,7	2
5	108,5	110,5	2	5	153,1	155,1	2	5	129,2	131,2	2	5	170,1	172,2	2,1	5	108	109,7	2
6	110,5	112,5	2	6	155,1	157,1	2	6	131,2	133	1,8	6	172,2	174,4	2,2	6	110	111,7	2
7	112,5	114,5	2	7	157,1	159,1	2	7	133	135,2	2,2	7	174,4	176,2	1,8	7	112	113,7	2
8	114,5	116,5	2	8	159,1	161,1	2	8	135,2	137,2	2	8	176,2	178,2	2	8	114	115,7	2
9	116,5	118,5	2	9	161,1	162,9	1,8	9	137,2	139,2	2	9	178,2	180,2	2	9	116	117,7	2
10	118,5	120,5	2	10	162,9	165,1	2,2	10	139,2	141,2	2					10	118	119,7	1,95
11	120,5	122,5	2	11	165,1	167,3	2,2	11	141,2	143,2	2					11	120	121,7	2,05
12	122,5	124,5	2	12	167,3	168,8	1,5	12	143,2	145,2	2					12	122	123,7	2
13	124,5	126,5	2	13	168,8	171	2,15	13	145,2	147,3	2,1					13	124	125,7	2
14	126,5	128,5	2	14	171	172,9	1,95	14	147,3	149,5	2,15					14	126	127,7	2
15	128,5	130,5	2	15	172,9	174,8	1,9	15	149,5	151,4	1,9					15	128	129,7	1,95
16	130,5	132,5	2	16	174,8	176,8	2	16	151,4	153,4	2					16	130	131,7	2,05
17	132,5	134,5	2	17	176,8	178,8	2	17	153,4	155,4	2					17	132	133,7	2
18	134,5	136,5	2	18	178,8	180,8	2	18	155,4	157,4	2								
19	136,5	138,5	2	19	180,8	182,8	2	19	157,4	159,3	1,95								
				20	182,8	184,8	2	20	159,3	161,3	2								
				21	184,8	186,8	2	21	161,3	163,4	2,05								
				22	186,8	188,8	2	22	163,4	165,3	1,95								
				23	188,8	190,8	2	23	165,3	167,3	2								
								24	167,3	169,3	2								

L'intera procedura di categorizzazione è stata implementata in un software dedicato, "TraceDNA" descritto qui di seguito.

## 11 Software “TraceDNA”

### *Scopi ed Obiettivi della creazione di un Software dedicato*

Fra gli scopi della creazione del software TraceDNA, prioritario è stato quello di rendere sempre più semplice e sicura la gestione del database relativo ai genotipi multi locus costituiti a partire dalla genotipizzazione di ciascun campione appartenente alle razze selezionate oggetto di studio, nonché dei campioni biologici ottenuti dai tagli commerciali, comunemente reperibili sul mercato, e provenienti da soggetti meticci e da soggetti non attribuibili ad incroci di razze pure note.

Altro scopo da raggiungere è stato quello di rendere automatizzabili le fasi preliminari del fondamentale procedimento di Categorizzazione e nomenclatura allelica, pur lasciando alla professionalità ed all'esperienza dell'operatore, la possibilità decisionale, nella valutazione caso per caso, dei genotipi più difficilmente interpretabili, attraverso la segnalazione automatica dei campioni interessati. Un ulteriore scopo era costituito dall'automatizzazione dei procedimenti di confronto testa a testa dei genotipi multi locus individuali contenuti nel database al fine di effettuare l'attribuzione di una precisa identità razziale ad un campione biologico prelevato dai tagli commerciali reperibili sul mercato. Il Software ha avuto infine come scopo l'implementazione dei calcoli per la statistica F di Wright, preliminare all'analisi della variabilità genetica, nonché i calcoli necessari alla stima delle principali distanze genetiche (Cavalli-Sforza, Nei, Edwards).

Gli obiettivi del lavoro svolto sono stati principalmente due:

- Fornire uno strumento per la memorizzazione e gestione delle informazioni relative ai campioni genomici analizzati tramite analizzatore di sequenze ABI Prism 310 (Applied Biosystems).
- Fornire degli strumenti per l'analisi e l'elaborazione dei suddetti campioni.

L'attività svolta si è focalizzata nello studio del dominio di azione e nella formalizzazione delle procedure di analisi e di elaborazione dei dati.

E' stato progettato e realizzato uno specifico software suddiviso nei seguenti moduli.

### 1. Gestione DataBase

Questo modulo permette di salvare le informazioni relative ai campioni su un DataBase dedicato (con la possibilità di condividere l'informazioni con altri utenti). Inoltre fornisce una serie di funzionalità di ricerca per esportare nuovamente i dati dei campioni e funzionalità specifiche per la generazione di report sullo stato delle informazioni presenti nel Database.

### 2. Categorizzazione allelica

Questo modulo si pone l'obiettivo di fornire un supporto all'operatore nella fase di categorizzazione dei dati molecolari. All'interno del procedimento di Categorizzazione, il software permette di agevolare e velocizzare la gestione di una grande quantità di dati all'interno delle seguenti fasi:

- Fase 1 Stima dei range allelici,
- Fase 2 Codifica allelica
- Fase 3 Calcolo ed applicazione del "fattore di allineamento"

La Fase 4 Attribuzione allelica viene comunque gestita da un operatore.

### 3. Calcolo delle Distanze genetiche

Questo modulo implementa i calcoli per la statistica F di Wright e le principali metodiche di stima delle distanze genetiche (Cavalli-Sforza, Nei, Edwards). A partire dai genotipi multilocus individuali appartenenti alle razze presenti nel database è possibile costruire il file data come punto di partenza per il calcolo delle distanze genetiche.

### 4. Attribuzione dell'identità individuale (Tracciabilità individuale)

Questo modulo si pone l'obiettivo di semplificare e velocizzare, a partire dal dato molecolare, le analisi necessarie ai confronti fra due o più profili genomici multilocus contenuti nel database costituito da migliaia di genotipi multilocus. A questo scopo, per determinare la corretta attribuzione di identità di un campione biologico, questo modulo permette il confronto tra il profilo genomico ottenuto da un campione biologico prelevato da

un animale in vita ed il profilo genomico ottenuto da un campione biologico del prodotto commercializzato prelevato sul mercato.

#### 5. Attribuzione dell'identità Razziale (Tracciabilità razziale)

Questo modulo permette di effettuare automaticamente l'attribuzione di identità razziale, a partire da genotipi precedentemente categorizzati, per le popolazioni oggetto di studio. Al fine di determinare l'appartenenza o meno di un determinato campione biologico ad una specifica razza, questo modulo permette di confrontare i genotipi multilocus ottenuti dai campioni biologici dei prodotti commercializzati prelevati sul mercato, con i genotipi multilocus delle razze presenti nel database oggetto di confronto ai fini dell'attribuzione dell'identità razziale.

#### *11.1 Dettagli del funzionamento del Software TraceDNA V.1.0*

- Gestione dei dati molecolari e informazioni utili, di ogni campione analizzato, in una banca dati con possibilità di ricerca, modifica e cancella.
- 1. Salvataggio e gestione dei dati molecolari in una banca dati con possibilità di salvare anche informazioni utili per ogni campione analizzato.
- 2. Banca dati che può essere condivisa contemporaneamente da più utenti localizzati in postazioni distinte anche geograficamente
- 3. La banca dati può essere arricchita per definire con sempre maggiore accuratezza il profilo di ogni razza che verrà analizzata
- Algoritmo per la Categorizzazione omogenea dei dati molecolari di più razze, con funzione di ricerca e scelta dei dati molecolari dal database per la successiva elaborazione.
- 1. Funzione ricerca e scelta dati molecolari dal database e successiva elaborazione.
- 2. L'algoritmo lavora su ogni locus da noi scelto e prevede anche l'intervento dell'operatore, soprattutto quando viene evidenziato un errore dal programma

3. Il programma alla fine restituisce un file Categorizzato dei dati molecolari
  - Algoritmo dell'attribuzione individuale e calcolo della probabilit  d'identit  per i marcatori utilizzati
1. Il programma confronta due o pi  profili e indica quanti alleli sono in comune e quanti e quali non lo sono per ogni confronto
2. Calcolo della probabilit  d'identit  per i marcatori utilizzati
  - Algoritmo dell'attribuzione di razza dei dati codificati e tabella di probabilit  di attribuzione di ogni soggetto analizzato
1. Possibilit  di confrontare ed attribuire i profili di uno o pi  soggetti con i profili dei soggetti presenti nella banca dati
2. Il programma restituisce una tabella che definisce la probabilit  di attribuzione di un soggetto alle razze analizzate

### *11.2 Ricadute ed applicazioni del Software*

Da un punto di vista operativo il vantaggio introdotto dal Software TraceDNA V.1.0 consiste principalmente nel aver formalizzato una serie di procedure di archiviazione ed elaborazione dei dati molecolari, che erano mantenute direttamente dall'operatore effettuando diversi passaggi manuali su appositi file Excel.

Il continuo incrementare dei dati molecolari presenti nel database, e conseguentemente l'ampliamento delle dimensioni dei suddetti file Excel, aveva reso molto complessa l'operazione di calcolo e soprattutto molto probabile e frequente l'eventualit  di errori dovuti all'operatore durante le varie fasi dell'elaborazione. L'utilizzo di un software che esegua automaticamente tali passaggi permette di ridurre il carico di lavoro dell'operatore ed annulla la possibilit  di introdurre errori di calcolo.



## **12 ANALISI STATISTICA SUL DATO MOLECOLARE CATEGORIZZATO**

### **12.1 Analisi delle popolazioni**

Per ogni popolazione allo studio sono stati determinati i parametri classici di genetica di popolazione. Quest'analisi preliminare è necessaria al fine di valutare la fattibilità di un test di assegnazione di razza (Mburu et al., 2002). Il metodo proposto richiede infatti il rispetto dell'equilibrio di Hardy Weinberg, l'assenza di linkage disequilibrium tra loci, oltre ad un minimo grado di separazione tra le razze, parametro importante per la precisione di assegnazione (Cornuet et al., 1999). Mediante il software Arlequin sono stati calcolati l'eterozigosità osservata e attesa e la significatività della differenza tra questi valori (deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg per ogni marcatore, per ogni razza), il numero di alleli per marcatore, per razza e il numero di alleli unici, presenti in una sola razza.

Dal numero di alleli condivisi tra i soggetti sono state calcolate le similarità genetiche, sia intra-razza, come parametro di omogeneità di popolazione, sia tra coppie di razze, per stimare la separazione di una razza dall'altra. Il valore di separazione tra coppie di popolazioni è stato valutato anche mediante il parametro  $F_{ST}$  (Canon et al., 2000), calcolato dal software Arlequin.

### **12.2 Impiego del software “Molkin” per l'analisi delle relazioni tra le varie razze**

Diversi parametri molecolari, come ad esempio gli indici di somiglianza, possono essere adottate per ottimizzare la gestione della diversità genetica in programmi di conservazione. Dai dati simulati, Oliehoek et al. (2006) hanno dimostrato che il molecular coancestry (Toro et al., 2002) è, tra gli stimatori possibili della parentela, il parametro più efficiente per le popolazioni strutturate, come ad esempio sono di solito le popolazioni che hanno bisogno di conservazione. Diversi studi hanno, pertanto, proposto l'uso del molecular coancestry come una misura della variabilità genetica e come strumento utile per la conservazione delle razze in via di estinzione (Toro et al., 2003; Alvarez et al., 2005; Ciampolini et al., 2007; Glowatzki-Mullis et al., 2008, 2009). Riportiamo i risultati ottenuti valutando i parametri molecolari intra e tra razze (Toro et al., 2002) per due razze ovine insulari (Sarda e Comisana dalla Sardegna, dalla Sicilia), diffuse in quasi tutte in tutta Italia, e per cinque razze ovine locali di piccole dimensioni del Sud Italia.

I dati molecolari sono stati analizzati utilizzando il programma Molkin v2.0 (Gutierrez et al., 2005).

A livello di razza sono stati calcolati i seguenti parametri: il numero di alleli per locus (A) corretto utilizzando il metodo di rarefazione di Hurlbert (1971), la diversità genica ( $H_e$ ), Wright's  $F_{IS}$  (1978), il coefficiente di consanguineità (F) derivati dal self-coancestry ( $s_i$ ).

Inoltre, i seguenti parametri sono stati stimati per singola razza e tra razze: il molecular coancestry coefficients (Caballero and Toro, 2002) e la distanza di kinship.

Il molecular coancestry tra due individui, i e j ( $f_{ij}$ ), è la probabilità che due alleli scelti casualmente dallo stesso locus in due individui siano identici per stato (Caballero e Toro, 2002).

Il molecular coancestry di un individuo con se stesso è il self-coancestry ( $s_i$ ), che è legato al coefficiente di consanguineità dell'individuo i ( $F_i$ ) con la formula  $F_i = 2s_i - 1$ .

A sua volta, la distanza di kinship ( $D_k$ ) tra due individui i e j è  $D_k = [(s_i + s_j)/2] - f_{ij}$ . MolKin calcola il molecular coancestry all'interno della razza e tra razze e la distanza di kinship semplicemente facendo la media dei corrispondenti valori per tutte le coppie presenti all'interno o tra popolazioni di individui.

### **13 Tracciabilità razziale mediante microsatelliti**

#### **13.1 Test di assegnazione di un individuo alla razza**

I test di assegnazione degli individui alla popolazione di appartenenza sono stati eseguiti mediante il metodo basato sulle frequenze alleliche (Paetkau et al., 1995) implementato nel software Arlequin. Il software analizza i profili allelici degli individui e restituisce un valore di likelihood (verosimiglianza) di ogni individuo, di appartenere ad ognuna delle razze analizzate. Il valore più alto corrisponde alla razza alla quale è più probabile che l'individuo appartenga. I valori di likelihood restituiti dal software sono stati confrontati tra razze, soggetto per soggetto, allo scopo di identificare la presenza di errori di assegnazione. Mediante una funzione implementata su foglio di calcolo Excel, per ogni individuo è stato verificato che il valore di likelihood più alto corrispondesse alla probabilità di appartenere alla razza corretta piuttosto che a qualsiasi altra tra quelle analizzate. La verifica è possibile

in questa fase di ottimizzazione della metodica dato che il lavoro è condotto su campioni di cui è nota la provenienza.

## **14 Analisi del polimorfismo ai geni della colorazione del mantello**

### *14.1 Design dei primers e amplificazione mediante PCR*

In collaborazione con la Faculté des Sciences et Techniques de Limoges, Ecole Doctorale Thématique “Biologie – Santé”, Unité de Génétique Moléculaire Animale UMR INRA 1061, è stata avviata una attività di genotipizzazione a loci di colorazione del mantello di capi ovini appartenenti alle razze oggetto di questa tesi. In particolare, è stata effettuata l'estrazione del DNA genomico da 35 campioni (5 per ciascuna delle razze in esame) di sangue, precedentemente stoccati a -20°C, utilizzando il kit GenElute Blood Genomic Dna Kit Minipreps (Sigma-Aldrich). Sulla base delle informazioni di sequenza disponibili per la specie bovina, sono stati disegnati i primers oligonucleotidici per i principali geni coinvolti nel determinismo del colore del mantello nei mammiferi. In particolare, sono state disegnate cinque coppie di primers per amplificare l'unico esone del gene *MC1R*, una coppia di primers per il gene *TYR*, tre coppie di primers per amplificare i 3 esoni del gene *ASIP*, sette coppie di primers per i sette esoni del gene *TYRP1*, otto coppie di primers per amplificare gli otto esoni del gene *TYRP2* e cinque coppie di primers per l'amplificazione del gene *SILVER*, per un totale di 25 coppie di primers (Tabella 12).

Sono, quindi, state effettuate, per ciascuna coppia di primers e per ciascun campione, delle reazioni di PCR e successiva elettroforesi dei frammenti su gel di agarosio all'1,5% per verificare l'avvenuta amplificazione.

**Tabella 12.** Primers disegnati per lo studio dei geni del mantello

#### MC1R

Mc1rSheepE1 CATGCCTGGGCCGACATTTGT  
 Mc1rSheepE2 CTCACCTTCAGGGATGGTCTA  
 Mc1rSheepF1 ATGCCTGTGCTCGGCTCCCAGAGGCG  
 Mc1rSheepR1 TCACCAGGAGCACTGCAGCACCTCTT  
 2MC1RF AGCCATGAGTTGAGCAGGAC  
 2MC1RR CAGGACACCAGCCTCCAG  
 3MC1RF GTGAGCGTCAGCAACGTG  
 3MC1RR ACATAGAGGACGGCCATCAG  
 4MC1RF GCCTGGTTGGCTTCTTCATA  
 4MC1RR TGGTCTAGCGATCCTCTTG

#### ASIP

ASIPex2F CACATGCATTTGCCAGACC  
 ASIPex2R ATCGGCTTGGAGAGTGTGTTG  
 ASIPex3F CAGAAGCTGCTGGCCTAAGT  
 ASIPex3R GCTCGAGGTCAGGAAGGTTT  
 ASIPex4F GCAGGTGGGGACATCTAGTC  
 ASIPex4R GCCCAACGTCAATAGCC

#### SILVER

Silvex1F GTTGCTGGAAGGAAGAACAGG  
 Silvex1R CTGGTTTTTCTCTCCCTAAAATG  
 Silvex2F GACACTGTTGTCCCCTGAGAAG  
 Silvex3R CCCTGGTATCCCAATGAGCTCA  
 Silvex4F TATTTTGGTAGCTAGGCGTATTC  
 Silvex5R CTTGGAGCCCGTAAGGGCCAG  
 Silvex6F CTTGGAGCCCGTAAGGGCCAG  
 Silvex6R CAATCCTTAGCTTAGCAGTGGA  
 Silvex7F CCAGCTCTGTCTGATTCTAAGCC  
 Silvex9R GCTGGTGGGACCCTGGGGAAGT

#### TYR

TyrSheepF1 TGGCTGTTTTGTACTGCCTG  
 TyrSheepR1 CCCTCCCATGTACTCATCTGT

#### TYRP1

Tyrp1ex1F AAGCTGTCCTGCATTCTTGCTTCAAG  
 Tyrp1ex1R CTCTACTTACCTGTGAGAACCCTCTG  
 Tyrp1ex2F AGTCAGGAGAAACCTTCTGGACTTAA  
 Tyrp1ex2R ACCTGCATGTCTCTCCAGCTGCAG  
 Tyrp1ex3F AGGAAATGTTGCAGGATCCTTCTTTC  
 Tyrp1ex3R ACTGTTGCAAAGGGTTCAGGGTAT  
 Tyrp1ex4F AGGCACTGAGGGTGGGCCAATTAAGA  
 Tyrp1ex4R CTTCCACTGTGTTTCGGAAGCTGTTT  
 Tyrp1ex5F AGGTTACAGTCATCCACAGGAAGGT  
 Tyrp1ex5R ACCAGCATTGTATCGCCTCAGCCATT  
 Tyrp1ex6F AGATATATCCACATATCCACTGGAAA  
 Tyrp1ex6R GGCCATTGAACCTCGTAAGTATAGCC  
 Tyrp1ex7F AGGTCGGAGTTTTAGCATTCTGAGA  
 Tyrp1ex7R ATGCATATGAGAATTTACATGTGTCA

#### TYRP2

Tyrp2ex1F TCAGTCTCTTCTCTAGAGCAAGGCGT  
 Tyrp2ex1R CAGTTGAAGAACTCCAGATTGGACC  
 Tyrp2ex2F CTGGCAGATCAATAGCATAACTGTAG  
 Tyrp2ex2R GGTCTTCAATCCTTACCGATGCCA  
 Tyrp2ex3F AGGACCACAAAAACAGGATCATTGGC  
 Tyrp2ex3R ACCCTCAGCTTCAGGAATGCCCTGGA  
 Tyrp2ex4F AGGGCATTCTGAAGCTGAGGGTAGA  
 Tyrp2ex4R TAGCTTGAATGACTACAACCGCCGAG  
 Tyrp2ex5F AGCTATCACAGACAATCTCCAGCTG  
 Tyrp2ex5R AGCGCCTTACTGGCAATGAGTCCTTC  
 Tyrp2ex6F AGGCGCTGGAGATCCCTTTCCAGCCA  
 Tyrp2ex6R ACATTATTAGGACCAGGGCGCCATA  
 Tyrp2ex7F CCTAATAATGTATCTCTGACGGAATA  
 Tyrp2ex7R ACAGGAACTTCGCCGGCTATAACTG  
 Tyrp2ex8F AGTTTCCTGTGCACCTGCAGGTCCGG  
 Tyrp2ex8R ACTGATCTCCCGTTCTAAAGCCATG

#### *14.2 Sequenziamento automatico*

Si procede quindi con le reazioni di sequenziamento diretto mediante BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA): 5 µl di ogni prodotto di PCR è stato purificato con 1 µl of Exosap-It® enzyme (USB Corporation) e digerito a 37°C per 60 minuti e ad 80°C per 15 minuti (fase di Clean Up).

Le PCR di sequenziamento sono state messe a punto in un volume totale di 20 µl contenente da 1 a 5 µl di DNA, a seconda dell'intensità della banda nelle foto del gel, 5 µl di BigDye®Terminator v1.1 reaction mix, 1 µl di ogni primer (forward e reverse) per sequenziare entrambi i filamenti secondo il seguente programma: denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, 25 cicli comprendenti denaturazione a 96°C per 10 secondi, 5 secondi di annealing alla temperatura di 55°C e 4 secondi di elongation a 60°C.

Le PCR di sequenziamento sono state purificate utilizzando 400 µl di Sephadex ® G-50 solution in ogni pozzetto del Millipore MultiScreen Assay System 96-Well Filtration Plate.

Le sequenze di frammenti di DNA sono state ottenute secondo il principio della tecnica di Sanger (Sanger et al., 1977) per mezzo di un sequenziatore automatico ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### *14.3 Analisi dati molecolari*

I dati relativi al segnale di fluorescenza registrato dal sequenziatore sono stati analizzati mediante apposito software Sequencing Analysis, Applied Biosystem. Il cromatogramma è stato poi importato sul software Sequencer 3.1.1 (Genecode) per permettere la comparazione e l'analisi fine delle sequenze.

I risultati derivanti dall'allineamento delle sequenze sono stati confrontati usando BLAST - Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## DISCUSSIONE DEI RISULTATI

### 15 Analisi del polimorfismo ai loci STR

Il numero di alleli per marcatore ottenuto nello studio, l'eterozigosità attesa ( $H_e$ ) ed osservata ( $H_o$ ), il test esatto dell'equilibrio di Hardy-Weinberg (P) e i valori di  $F_{ST}$  per ogni marcatore utilizzato sull'intero campione popolazionistico sono riportati in tabella 13.

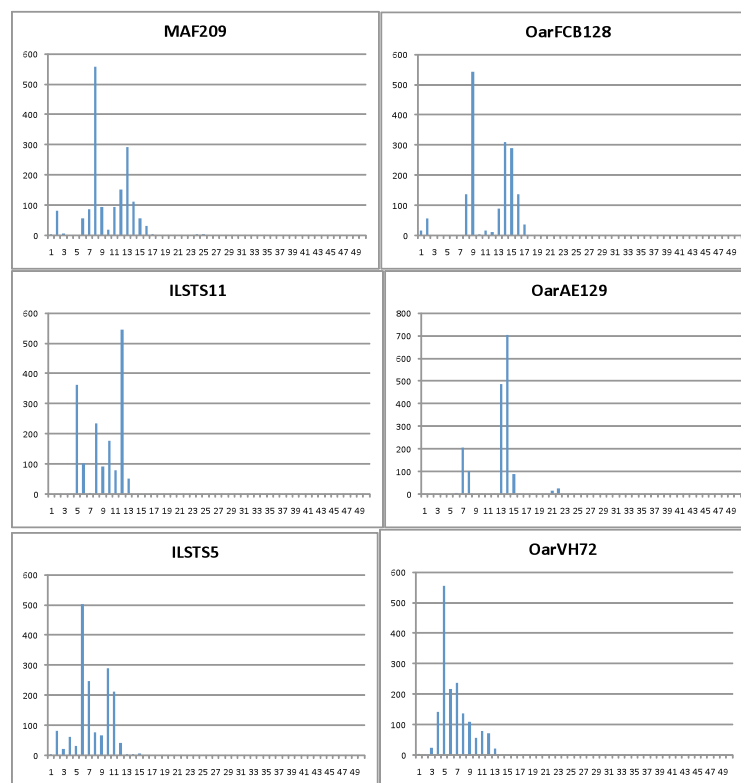
Per i 19 marcatori analizzati è stato evidenziato un buon grado di polimorfismo, con un totale di 338 alleli, un numero di alleli per marcatore variabile tra 10 (locus BM1824) e 31 (locus MAF214), ed un numero medio di alleli per locus pari a 17,79 ( $\pm 4,95$ ).

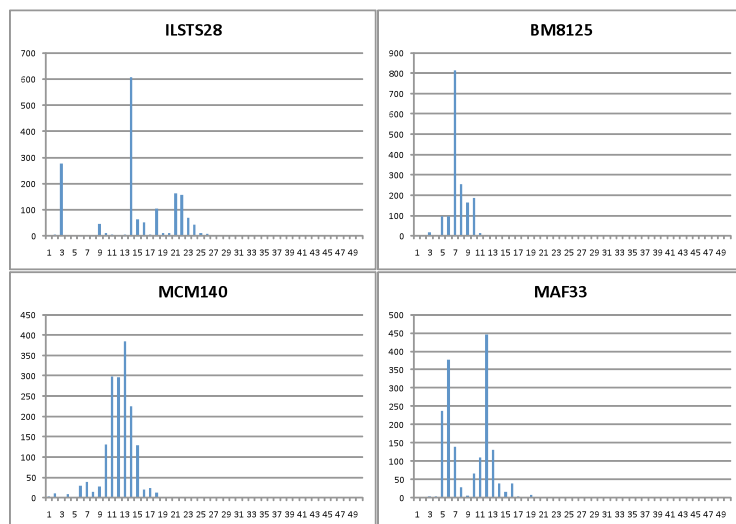
**Tabella 13**

Locus	$N_a$	$H_e$	$H_o$	p	$F_{ST}$
BM1824	10	0,7321	0,6192	0,0000	0,0565
BM8125	11	0,6938	0,6404	0,1185	0,0343
ILSTS11	14	0,8092	0,7127	0,0000	0,0350
ILSTS28	24	0,7977	0,6225	0,0000	0,0316
ILSTS5	18	0,8325	0,6220	0,0000	0,0421
INRA063	20	0,8512	0,8016	0,0000	0,0391
MAF209	18	0,8298	0,7808	0,0019	0,0278
MAF214	31	0,7648	0,6333	0,0000	0,0536
MAF33	18	0,8360	0,7517	0,0000	0,0544
MAF65	12	0,7797	0,7337	0,0000	0,0420
MAF70	21	0,8899	0,7737	0,0000	0,0380
MCM140	17	0,8531	0,8073	0,0033	0,0359
OarAE129	14	0,6974	0,4391	0,0000	0,0660
OarFCB128	16	0,8079	0,7507	0,0000	0,0562
OarFCB193	18	0,5727	0,4966	0,0000	0,0962
OarFCB304	21	0,7871	0,6346	0,0000	0,0715
OarJMP29	21	0,8635	0,8003	0,0000	0,0357
OarJMP58	20	0,8521	0,7626	0,0000	0,0376
OarVH72	14	0,8282	0,7131	0,0000	0,1054
media	17,79	0,7936	0,6893		0,0505
dev. st.	4,95	0,0759	0,1034		0,0214

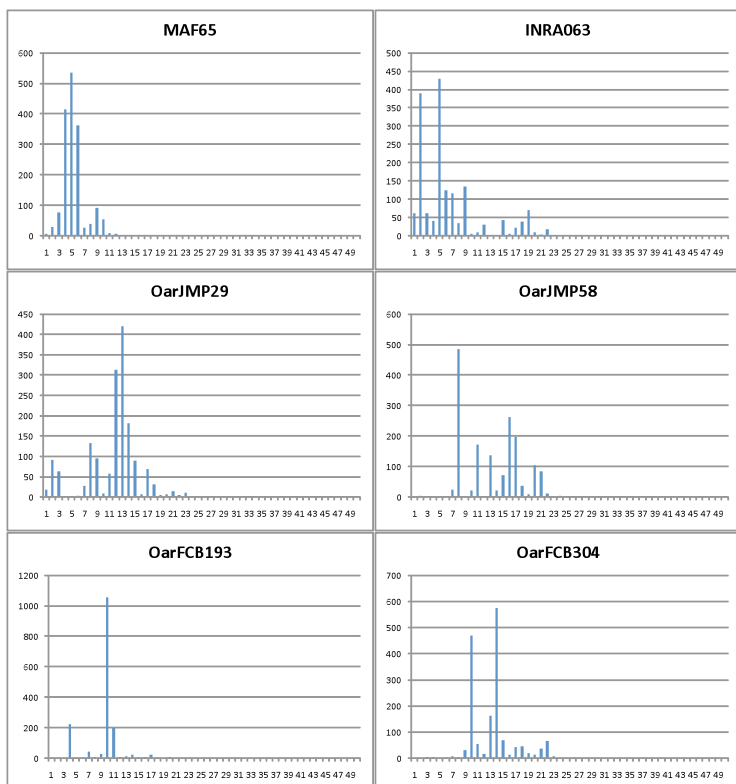
L'analisi intra-razza ha confermato il numero minimo di alleli (4) al locus BM1824 mentre il numero più alto di alleli è stato osservato al locus OarJMP29 (19) e non al locus MAF214. Ciò sembra ascrivibile al fatto che molti dei 31 alleli del locus MAF214 sono a bassa frequenza, come si evince dai grafici di distribuzione delle frequenze alleliche (Figura 5) e, pertanto, non si osservano in tutte le sette razze analizzate. Dai grafici di distribuzione delle frequenze alleliche emerge anche, per il locus MAF214, un particolare andamento trimodale.

**Figura 5** Grafico delle distribuzioni delle frequenze alleliche per ogni locus STR nella popolazione complessiva (continua).

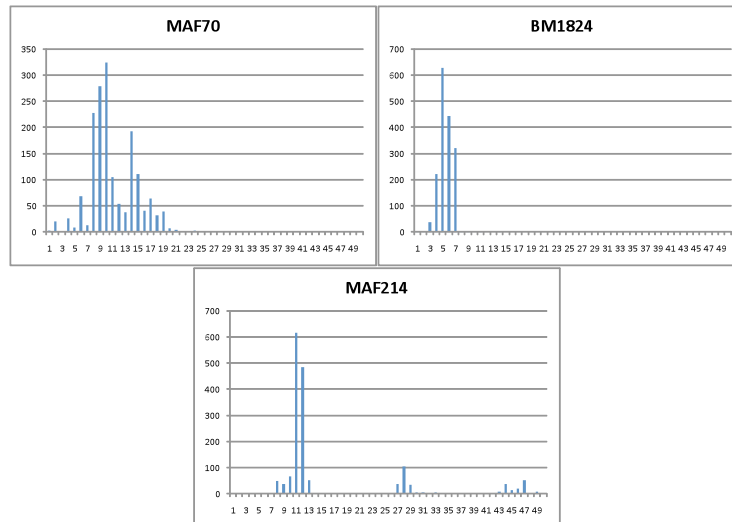




**Figura 6** Grafico delle distribuzioni delle frequenze alleliche per ogni locus STR nella popolazione complessiva (fine).



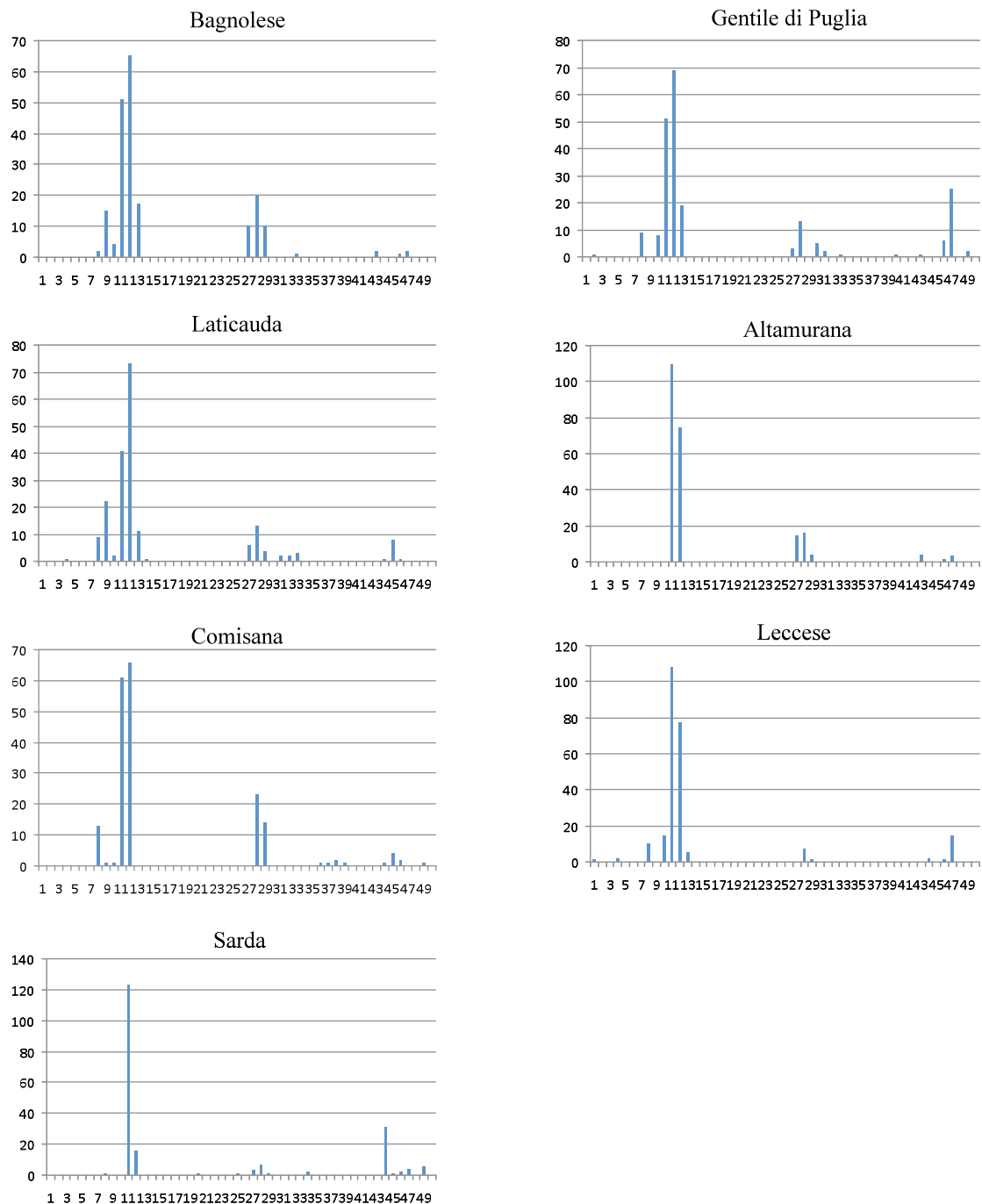




L'ampio *range* allelico (31 alleli) nonché il particolare andamento trimodale della distribuzione delle frequenze alleliche al locus MAF214 potrebbe essere spiegato dalla compresenza, per questo locus, dei entrambi i meccanismi mutazionali alla base della creazione di nuovi alleli a loci microsatelliti. Il meccanismo più comune, SMM (*stepwise mutation model*), presuppone che nuovi alleli si formino per eventi mutazionali dovuti allo scivolamento della polimerasi durante la replicazione, secondo un fenomeno noto come *Slipped Strand Mismatching* (SSM). Molti di questi errori sono corretti dall'attività enzimatica di *proofreading* esonucleotidica ma tanti sfuggono ai sistemi di riparo del DNA, con conseguente aumento o riduzione di una o due ripetizioni dell'unità di base. Diversamente, secondo il meccanismo mutazionale meno frequente, IAM (*infinite allele model*) (Amos et al., 1996; Henderson e Petes 1992; Weber & Wong 1993), nuovi alleli a loci microsatelliti originerebbero in seguito ad eventi di ricombinazione imperfetta tra cromosomi omologhi, per cui potrebbero presentare variazioni più drastiche nel numero di ripetizioni rispetto all'allele originario. Quindi, tornando al locus MAF214, sebbene la maggior parte degli alleli sembrerebbe essersi generato secondo lo *stepwise mutation model*, il salto di numerose paia di basi, che si osserva, nel grafico della distribuzione delle frequenze alleliche, tra i diversi "blocchi" allelici sarebbe verosimilmente ascrivibile ad eventi di ricombinazione imperfetta; ciò spiegherebbe, quindi, la notevole ampiezza del range allelico per tale marcatore. A conferma dell'ipotesi che l'andamento trimodale della distribuzione delle frequenze alleliche osservato per il locus MAF214 non fosse dovuto ad artefatti, oltre ai dati di letteratura (Ligda et al., 2009; Jandurova et al., 2005; Dalvit et al., 2009; Małgorzata, et al., 2008; Stahlberger-Saitbekova et al., 2001) che supportano

l'evidenza di un così ampio range allelico per tale locus, c'è il fatto che tale andamento risulta essere conservato anche all'interno delle singole razze (Figura 7). Per gli altri loci, per quanto non si possano escludere eventi di ricombinazione imperfetta, sembrerebbe predominante il modello mutazionale classico SMM.

**Figura 7** Grafico delle distribuzioni delle frequenze alleliche al locus MAF214 all'interno di ciascuna razza.



Per poter confrontare il polimorfismo, espresso in termini di numero di alleli, tra le diverse razze, la cui numerosità del campione in esame variava leggermente e, per poter effettuare dei confronti con i dati di letteratura, sono stati calcolati, per ciascun locus e per ciascuna razza, i valori di ricchezza allelica. I valori di ricchezza allelica stimati per i 19 STR utilizzando i *software* HPRARE e FSTAT sono compresi tra 8,80 e 11,61 (Tabella 14), tendenzialmente più alti rispetto a quelli riportati in letteratura per altre razze ovine italiane (6,5-8,4; Dalvit et al., 2008) e nord europee (2,62 – 6,26; Tapio et al., 2005; 5,00 -7,52; Peter et al. 2007). Il valore di ricchezza allelica più basso si osserva in una delle due razze isolate, la Sarda. Alla base di ciò potrebbe esserci il maggior isolamento geografico che la razza Sarda avrebbe sperimentato rispetto alle altre razze ed anche rispetto all'altra popolazione isolana, la Comisana, che, per le diverse vicende storiche dell'isola, ha subito nel tempo l'influsso di popolazioni di origine asiatica e africana. In aggiunta, una gestione più efficace e razionale del Libro Genealogico della Sarda rispetto alle altre razze avrebbe, da un lato, contribuito a rendere più omogenea la popolazione per effetto della selezione e, dall'altro, avrebbe impedito episodi di incrocio, relativamente frequenti nella storia, anche non molto remota, delle altre razze. Come atteso, anche per la razza Altamurana, ovvero per la razza numericamente più compromessa tra quelle analizzate, si sono osservati valori di ricchezza allelica molto bassi. In maniera interessante, tuttavia, si è osservato che per tale razza, il valore di ricchezza allelica non risulta significativamente diverso da quello osservato per la Sarda, per la popolazione, cioè, numericamente più rappresentata sul territorio nazionale. Tra le più probabili spiegazioni di questo risultato, che può sembrare in prima analisi paradossale, la possibile presenza, nel campione dei soggetti appartenenti alla razza Altamurana, di alleli di origine alloctona in seguito ad eventi di incrocio nonché la minore omogeneità della popolazione a causa di una minore pressione selettiva.

**Tabella 14** Valori di *allele richness* stimati per ciascun locus all'interno di ciascuna razza.

Locus	Allele Richness						
	Altamura	Bagnolese	Comisana	Gentile di P.	Laticauda	Leccese	Sarda
BM1824	7,39	4,00	5,88	6,68	4,00	7,23	3,91
BM8125	6,79	7,99	7,00	5,97	8,88	7,92	4,91
ILSTS11	8,75	7,90	8,88	10,64	8,00	9,47	7,82
ILSTS28	11,32	13,97	15,68	13,58	16,38	11,88	11,63
ILSTS5	9,37	11,89	12,87	12,47	13,58	9,96	8,91
INRA063	14,24	13,97	15,75	15,27	14,79	13,32	13,71
MAF209	11,62	12,79	12,94	11,95	11,90	13,84	10,80
MAF214	7,78	12,77	14,56	15,27	16,57	11,08	13,53
MAF33	13,77	9,80	10,93	10,00	8,89	10,69	8,99
MAF65	7,87	7,99	9,87	8,50	11,00	9,46	7,91
MAF70	15,45	12,89	17,79	15,78	15,78	17,32	8,99
MCM140	10,78	11,89	11,93	11,77	11,69	12,38	8,82
OarAE129	5,58	7,99	5,87	10,31	6,00	6,42	5,00
OarFCB128	8,75	9,88	6,81	8,97	9,80	9,74	6,91
OarFCB193	6,32	14,40	8,93	7,77	10,69	5,21	6,89
OarFCB304	7,39	12,69	11,87	12,84	14,47	15,81	8,91
OarJMP29	14,48	12,79	12,86	18,44	13,79	13,35	10,99
OarJMP58	12,35	12,88	10,94	13,63	11,90	15,28	9,82
OarVH72	9,79	8,90	11,81	10,66	8,80	12,65	8,82
media	9,99	10,91	11,22	11,61	11,42	11,21	8,80
dev. st.	3,01	2,82	3,43	3,29	3,50	3,25	2,66

L'analisi degli alleli "privati" (alleli presenti in una soltanto tra le razze analizzate) ha evidenziato, complessivamente, 65 alleli "privati", su un totale di 338 alleli osservati (19,23%, dati non mostrati). Tuttavia, di questi, 62 (95,38%) sono a bassa frequenza (< 3%). Gli unici 3 alleli privati con valori di frequenza superiori al 3% sono stati osservati nella razza Altamura (2) e Leccese (1).

L'analisi condotta con HPRARE e FSTAT ha evidenziato il valore più basso di *private allele richness* per la razza Sarda ed i valori più alti per le razze Altamura e Leccese (Tabella 15).

**Tabella 15** Valori di *private allele richness* stimati per ciascun locus all'interno di ciascuna razza.

Locus	Private Allele Richness						
	Altamura	Bagnolese	Comisana	Gentile di P.	Laticauda	Leccese	Sarda
BM1824	1,61	0,00	0,99	1,06	0,00	0,87	0,00
BM8125	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00	0,00
ILSTS11	0,96	0,00	0,16	1,10	0,00	0,74	0,15
ILSTS28	0,79	1,19	0,03	0,00	0,02	0,00	0,91
ILSTS5	0,00	0,91	0,20	0,00	1,80	0,00	1,00
INRA063	1,09	0,00	0,00	0,18	0,00	0,98	0,00
MAF209	0,00	0,90	0,02	0,00	0,00	1,05	1,00
MAF214	0,00	0,00	3,81	2,68	1,00	0,83	2,81
MAF33	2,78	0,00	0,07	0,00	0,00	0,81	0,00
MAF65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
MAF70	0,00	0,10	1,00	0,00	0,99	0,00	0,00
MCM140	0,20	1,00	0,01	0,00	0,00	1,16	0,00
OarAE129	0,79	1,02	0,16	1,11	0,00	0,12	0,00
OarFCB128	1,00	0,90	0,94	0,00	0,90	0,74	0,00
OarFCB193	0,07	0,00	0,10	0,00	1,02	0,00	0,19
OarFCB304	0,00	0,00	0,03	0,00	0,02	1,48	0,00
OarJMP29	0,00	0,10	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
OarJMP58	0,20	1,99	0,00	0,39	0,00	0,53	0,00
OarVH72	0,00	0,00	0,94	0,00	0,02	0,84	0,00
media	0,50	0,43	0,45	0,34	0,36	0,53	0,32
dev. st.	0,75	0,60	0,90	0,69	0,56	0,49	0,70

### 15.1 Test dell'equilibrio di Hardy-Weinberg

Come ipotizzabile, nel campione complessivo sono stati stimati, per i 19 loci STR, valori di eterozigosità attesa ( $H_e$ ) media molto più elevati ( $0,79 \pm 0,07$ ) rispetto a quanto stimato per i 104 loci SNP ( $0,39 \pm 0,09$ ). Ciò è pienamente in linea con quanto riportato in letteratura da Glover et al. (2010) in un recente lavoro, condotto su popolazioni di salmonidi, nelle quali è stata stimata un'eterozigosità attesa media pari a 0,32 utilizzando 300 loci SNP, contro valori pari a 0,78 utilizzando 14 loci STR. All'interno di ciascuna razza i valori di  $H_e$  media, calcolata per i 19 loci STR, variano da  $0,71 \pm 0,12$  (Sarda) a  $0,78 \pm 0,1$  (Gentile di Puglia e Leccese) mentre l'eterozigosità osservata ( $H_o$ ) va da un minimo di  $0,64 \pm 0,13$  nella razza Altamura ad un massimo di  $0,73 \pm 0,10$  nella razza Laticauda (Tabella 16). Per quanto riguarda l'eterozigosità attesa,  $H_e$ , i dati, ottenuti dalla genotipizzazione delle razze oggetto

di studio, confermano quanto riportato in letteratura da Rendo et al. (2004) in razze ovine spagnole e Dalvit et al.(2008) in razze ovine autoctone delle alpi tedesche, italiane e slovene, i quali stimano, per i loci STR, un'eterozigosità attesa rispettivamente variabile, da razza a razza, tra 0,73 e 0,79 e tra 0,73 e 0,82; valori leggermente più bassi sono stati stimati per razze ovine greche (da 0,68 a 0,76; Ligda et al., 2009) e portoghesi (da 0,68 a 0,77; Santos-Silva et al., 2008). I valori più bassi, compresi tra 0,60 e 0,71, sono stati riportati in un lavoro sulle relazioni filogenetiche tra razze ovine svizzere genotipizzate con 31 microsatelliti (Stahlberger-Saitbekova et al., 2001). Anche per l'eterozigosità osservata media, calcolata per i 19 loci STR, i risultati sono in linea con quanto riportato dalla maggior parte degli autori, che hanno stimato valori compresi tra 0,63 e 0,74 in razze ovine greche (Ligda et al.; 2009), tra 0,679 e 0,763 in popolazioni ovine Merino (Diez-Tascon et al., 2000), tra 0,578 e 0,728 in razze ovine alpine (Dalvit et al., 2008) e tra 0,65 e 0,72 in razze ovine portoghesi (Santos-Silva et al., 2008). Valori relativamente più alti (da 0,696 a 0,784) sono stati riportati da Rendo et al. (2004) in sei razze ovine del nord della penisola Iberica e da Arranz et al. (1998) nelle razze ovine spagnole Churra, Latxa, Manchega, Rasa-Aragonesa e Merinos (da 0,713 a 0,771).

**Tabella 16** Eterozigosità osservata (Ho) e attesa (He) all'equilibrio di H-W e valore di significatività delle differenze tra proporzione di genotipi eterozigoti osservati e proporzione di genotipi eterozigoti attesi sulla base dell'equilibrio di Hardy Weinberg per ciascun locus STR e all'interno di ciascuna razza.

Locus	Altamura			Bagnolese			Comisana			Gentile di Puglia		
	Ho	He	p	Ho	He	p	Ho	He	p	Ho	He	p
BM1824	0,6404	0,7416	0,1373	0,4800	0,7139	0,0000	0,6042	0,7010	0,0000	0,5463	0,7037	0,0007
BM8125	0,6842	0,7328	0,5899	0,6300	0,6101	0,2929	0,7292	0,7152	0,0964	0,5370	0,6018	0,1699
ILSTS11	0,6228	0,7056	0,0000	0,7900	0,8029	0,0497	0,6875	0,8116	0,0002	0,6852	0,8174	0,0000
ILSTS28	0,5000	0,8141	0,0000	0,7100	0,7924	0,2463	0,7396	0,8101	0,0071	0,5000	0,8350	0,0000
ILSTS5	0,4912	0,7880	0,0000	0,6300	0,8093	0,0000	0,6042	0,7426	0,0000	0,6852	0,8675	0,0000
INRA063	0,7946	0,7924	0,2104	0,8000	0,8256	0,0251	0,8021	0,8414	0,0166	0,8037	0,8174	0,7337
MAF209	0,7895	0,8467	0,0312	0,7900	0,8114	0,4015	0,8229	0,8440	0,0543	0,8148	0,8385	0,8439
MAF214	0,5965	0,6518	0,0626	0,5300	0,8048	0,0000	0,7396	0,7598	0,1829	0,7315	0,8164	0,0023
MAF33	0,8333	0,8638	0,0213	0,8100	0,7500	0,2228	0,7396	0,8127	0,0000	0,6667	0,8257	0,0000
MAF65	0,6726	0,6991	0,9079	0,7700	0,8071	0,0011	0,6771	0,6709	0,3810	0,6542	0,7137	0,2029
MAF70	0,6195	0,8708	0,0000	0,8900	0,8597	0,1423	0,6563	0,8306	0,0000	0,6852	0,8826	0,0009
MCM140	0,7807	0,7965	0,0201	0,8400	0,8410	0,3223	0,8750	0,8324	0,3360	0,7500	0,8201	0,0012
OarAE129	0,4825	0,5322	0,0013	0,4694	0,6548	0,0000	0,5208	0,6738	0,0005	0,3704	0,7176	0,0000
OarFCB128	0,7544	0,7758	0,4664	0,7400	0,7507	0,1924	0,6042	0,6577	0,0106	0,7037	0,8119	0,0985
OarFCB193	0,3947	0,4268	0,1439	0,5200	0,6295	0,0662	0,5208	0,6016	0,0614	0,5556	0,5783	0,0816
OarFCB304	0,4211	0,5467	0,0140	0,7000	0,7997	0,0036	0,6146	0,8000	0,0000	0,7037	0,7829	0,0001
OarJMP29	0,7699	0,8453	0,0046	0,8600	0,8473	0,1468	0,7813	0,8288	0,0600	0,8113	0,8606	0,1920
OarJMP58	0,6637	0,8347	0,0001	0,8100	0,8393	0,1272	0,7604	0,8273	0,0007	0,7664	0,7983	0,1646
OarVH72	0,7281	0,8332	0,0001	0,7100	0,7537	0,1732	0,7188	0,7185	0,6217	0,7407	0,8110	0,0004
media	0,6442	0,7420		0,7094	0,7738		0,6946	0,7621		0,6690	0,7842	
dev. st.	0,1337	0,1240		0,1311	0,0737		0,0982	0,0749		0,1181	0,0842	

Locus	Laticauda			Leccese			Sarda		
	Ho	He	p	Ho	He	p	Ho	He	p
BM1824	0,6600	0,6555	0,7089	0,5537	0,7472	0,0000	0,8687	0,5932	0,0000
BM8125	0,6200	0,6114	0,0904	0,6000	0,7446	0,0016	0,6970	0,6821	0,2209
ILSTS11	0,7300	0,7555	0,0016	0,7107	0,7980	0,0000	0,7778	0,8099	0,7001
ILSTS28	0,7000	0,6803	0,0156	0,5246	0,7274	0,0000	0,7374	0,7747	0,0868
ILSTS5	0,6900	0,8140	0,0000	0,5703	0,8153	0,0000	0,7071	0,7708	0,0911
INRA063	0,8800	0,8957	0,0618	0,8443	0,8388	0,0018	0,6768	0,7469	0,0003
MAF209	0,7900	0,7982	0,0916	0,7623	0,8567	0,0050	0,6970	0,6563	0,4433
MAF214	0,6800	0,8039	0,0001	0,6885	0,6967	0,0367	0,4546	0,5831	0,0000
MAF33	0,7100	0,6883	0,0914	0,7000	0,8292	0,0006	0,8081	0,7900	0,1667
MAF65	0,7600	0,8115	0,1218	0,7934	0,7857	0,7372	0,8081	0,7716	0,3132
MAF70	0,8200	0,8645	0,0282	0,8279	0,9063	0,0000	0,9293	0,7957	0,0000
MCM140	0,7700	0,8194	0,6733	0,7917	0,8378	0,0023	0,8586	0,8430	0,7799
OarAE129	0,4316	0,6818	0,0000	0,3554	0,6669	0,0000	0,4647	0,6890	0,0000
OarFCB128	0,8500	0,8342	0,2689	0,8099	0,7994	0,0767	0,7778	0,7352	0,5464
OarFCB193	0,8000	0,7325	0,0656	0,3607	0,4013	0,5267	0,3636	0,3425	0,7578
OarFCB304	0,6300	0,6654	0,0641	0,7623	0,8455	0,0192	0,6061	0,7303	0,0101
OarJMP29	0,8300	0,8414	0,4183	0,7459	0,8254	0,0000	0,8182	0,8093	0,9568
OarJMP58	0,8200	0,8508	0,3496	0,7951	0,8451	0,1142	0,7273	0,7717	0,6545
OarVH72	0,7400	0,6962	0,5072	0,7869	0,8652	0,0302	0,5455	0,5432	0,5048
media	0,7322	0,7632		0,6833	0,7806		0,7012	0,7073	
dev. st.	0,1042	0,0838		0,1492	0,1103		0,1527	0,1215	

## 16 Analisi delle popolazioni

Sulle singole razze sono stati testati i principali parametri di genetica di popolazione.

### 16.1 Analisi della differenziazione genetica

Il grado di differenziazione genetica tra coppie di razze è stato valutato sulla base delle frequenze alleliche dei marcatori STR, stimando il parametro  $F_{ST}$  (Tabella 17). Il valore più alto di  $F_{ST}$  si osserva per la coppia composta dalle razze Altamurana e Sarda, mentre il valore più basso si osserva per la coppia di razze Bagnolese e Laticauda. Tutti i confronti sono risultati significativi ( $p < 0,01$ ). I valori di  $F_{ST}$  ottenuti, per tutte le possibili coppie di razze con i marcatori microsatelliti sono significativamente correlati ( $r$  di Pearson = 0,76;  $p = 0,0001$ ). In numerosi studi condotti con marcatori STR su razze ovine europee, mediorientali e indiane le stime del parametro  $F_{ST}$  tra coppie di razze non superano valori di 0,10 (0,064,



Dalvit et al.; 2008; 0,057, Peter et al., 2007; 0,095, Alvarez et al., 2004; 0,08, Baumung et al. 2006; 0,083, Sodhi et al, 2006).

**Tabella 17** Valori di  $F_{ST}$  calcolati, su tutte le possibili coppie di razze, per i marcatori molecolari STR.

Razza	Altamurana	Bagnolese	Comisana	Gentile di P.	Laticauda	Leccese	Sarda
Altamurana	*						
Bagnolese	0,0560	*					
Comisana	0,0564	0,0255	*				
Gentile	0,0357	0,0356	0,0435	*			
Laticauda	0,0607	0,0188	0,0479	0,0450	*		
Leccese	0,0321	0,0386	0,0397	0,0296	0,0554	*	
Sarda	0,0854	0,0572	0,0529	0,0769	0,0782	0,0748	*

La razza Sarda appare la razza maggiormente differenziata rispetto a tutte le altre; il risultato era prevedibile, considerato l'isolamento riproduttivo a cui la popolazione ovina di un'isola come la Sardegna è stata sottoposta per secoli (solo negli ultimi decenni la razza si è diffusa nell'Italia Continentale, con particolare riferimento a Lazio e Toscana). L'Altamurana risulta, sulla base dei valori di  $F_{ST}$  pair-wise, la popolazione che, dopo la Sarda, maggiormente appare differenziata, da tutte le altre razze, ivi compresa l'altra razza pugliese, la Leccese, tradizionalmente considerata ad essa prossima dal punto di vista filogenetico. Entrambe sembrerebbero derivare da un comune antenato, individuato da molti Autori in pecore del ceppo Zackel, da cui si sarebbero poi differenziate le attuali Altamurana e Leccese, anche a seguito della selezione nei confronti della resistenza all'iperiodermatosi, dermatite da fotosensibilizzazione provocata dalla ingestione di *Hypericum*, particolarmente diffuso nei pascoli del Salento. Alcuni Autori hanno evidenziato che una maggiore differenziazione genetica tra gruppi o sottopopolazioni anche geograficamente prossimi potrebbe essere dovuta alla presenza di inbreeding o essere conseguente ad eventi di bottleneck o ad effetto del fondatore (Beja-Pereira et al., 2003; Paetkau et al. 1997).

## 16.2 *Molkin*

Alcuni parametri che caratterizzano la variabilità genetica delle razze ovine analizzate sono riportati nella tabella 18.

La razza Sarda ha mostrato il minor numero di alleli rarefatti (8,88), il valore più basso di eterozigosità attesa (0,707) ed i valori più alti di molecular coancestry (0,30), evidenziando un basso livello di variabilità genetica. Tuttavia, la razza evidenzia il valore più basso di FIS (0,003) e un valore basso per il coefficiente di consanguineità (0,298), suggerendo che i bassi livelli di variabilità genetica osservati negli animali di razza Sarda non sono imputabili ad accoppiamento tra parenti.

Allo stesso modo, Moioli et al. (2006) hanno osservato, in una analisi della diversità genetica tra Gentile di Puglia, Sopravissana e pecore razza Sarda utilizzando 13 marcatori microsatelliti, un basso numero di alleli (4,4), un basso valore della diversità genetica (0,53) e il valore minimo di FIS (0,137) per la razza Sarda; tuttavia, tale ricerca è stata condotta su un campione di popolazione di piccole dimensioni (25 soggetti di razza Gentile di Puglia, il 20 di Sopravissana e 15 animali di razza Sarda) così il possibile effetto del campionamento potrebbe spiegare le differenze osservate nei valori dei parametri.

Di fatto, valori di diversità genetica (0,75) e numero medio di alleli (7,34) più simili a quelli osservati in questa tesi, sono stati precedentemente riportati da Pariset et al. (2003), che hanno analizzato 376 pecore di razza Sarda raccolte in 17 aziende del Centro Italia. Nella stessa ricerca, è stato riportato un valore medio di FIS superiore rispetto a quello osservato nella nostra analisi (0,19 vs 0,003); questa differenza potrebbe essere ascrivibile al fatto che, nel nostro studio, è stato utilizzato un campione di giovani arieti di razza Sarda, entrati nella stazione di prova di progenie, provenienti dall'intero territorio nazionale.

**Tabella 18** Numero di individui (N), diversità genica (He), inbreeding coefficient (F), molecular coancestry (fii), kinship distance (Dk), heterozygote deficiency (FIS) e numero medio di alleli per locus rarefatto a 180 coppie, per ogni razza.

Razza	N	He	F	fii	FIS	Dk	A
Bagnolese	100	0,774	0,290	0,30	0,078	0,415	10,91
Laticauda	100	0,763	0,267	0,24	0,035	0,393	11,43
Comisana	96	0,762	0,304	0,24	0,082	0,410	11,22
Sarda	99	0,707	0,298	0,30	0,003	0,353	8,88
Gentile di Puglia	108	0,784	0,331	0,22	0,140	0,446	11,61
Altamurana	114	0,742	0,356	0,26	0,130	0,416	9,99
Leccese	122	0,781	0,316	0,22	0,120	0,436	11,21
Campione totale	739	0,793	0,310	0,21	0,090	0,395	

Per contro, la Gentile di Puglia sembra mostrare il massimo livello di variabilità genetica, come evidenziato dal più alto numero di alleli rarefatti (11,61) e dal massimo valore della diversità genica (0,784).

La Gentile di Puglia è risultata essere la razza più variabile anche nello studio di al Moioli et al. (2006), rispetto alle razze Sarda e la Sopravissana. Risultati analoghi sono stati segnalati anche da D'Angelo et al. (2008) che osservano valori elevati di diversità genica (0,767) per quella razza. D'Angelo et al. (2008) riportato carenza di eterozigosità per la razza, come evidenziato nel nostro studio (FIS = 0,14). Insieme al basso molecular coancestry, questi risultati suggeriscono una possibile stratificazione della razza in sottopopolazioni geneticamente distinte, probabilmente derivato dalla mancanza di scambio tra gruppi di montoni e/o strategie di gestione divergenti all'interno di ogni gruppo.

Una simile ipotesi può essere formulata anche per la razza Leccese. Questa ipotesi è sostenuta dal più elevato molecular coancestry osservato nei singoli allevamenti rispetto al campione totale della razza. Ad esempio, nella razza Leccese, è stato osservato un molecular coancestry intra-razza di 0,220, rispetto a valori compresi tra 0,296 a 0,360 (dati non riportati) osservati nei singoli allevamenti. I modelli di variabilità genetica osservata per le altre razze appaiono meno evidenti.

Le razze studiate hanno mostrato una bassa ma significativa differenziazione genetica ( $F_{ST} = 0,049$ ). Questi risultati sono conformi con altri studi effettuati su razze ovine europee e mediorientali ( $F_{ST} = 0,057$ , Peter et al., 2007) e su razze ovine etiopi ( $F_{ST} = 0,046$ , Gizaw et al., 2007) anche se altri autori osservato valore leggermente superiori di  $F_{ST}$ , come Dalvit et al. (2008) sulle razze ovine alpine ( $F_{ST} = 0,064$ ), Baumung et al. (2006) su razze ovine austriache ( $F_{ST} = 0,08$ ) e Alvarez et al. (2005) su razze ovine spagnole ( $F_{ST} = 0,070$ ). Le matrici del molecular coancestry tra-razze ( $f_{ij}$ ) e della distanza di kinship ( $D_k$ ) sono riportate nella tabella 19.

**Tabella 19** Molecular coancestry tra razze (sotto la diagonale) e distanza di kinship tra razze (sopra la diagonale).

Razza	1	2	3	4	5	6	7
1. Bagnolese		0,404	0,413	0,384	0,431	0,416	0,426
2. Laticauda	0,225		0,401	0,373	0,421	0,405	0,417
3. Comisana	0,224	0,220		0,381	0,429	0,413	0,424
4. Sarda	0,238	0,235	0,247		0,402	0,387	0,399
5. Gentile di Puglia	0,208	0,209	0,211	0,223		0,431	0,440
6. Altamurana	0,223	0,226	0,228	0,242	0,225		0,426
7. Leccese	0,208	0,206	0,213	0,224	0,208	0,227	

L'elevata correlazione tra  $D_k$  e  $f_{ij}$  (circa 0,80) dimostra che i due parametri offrono le stesse informazioni. I valori più bassi del molecular coancestry sono stati trovati tra Gentile di Puglia vs Bagnolese vs Laticauda e tra Leccese vs Bagnolese vs Leccese e vs Laticauda, mostrando che esiste bassa identità genetica tra queste razze.

I valori più alti di  $f_{ij}$  sono stati osservati tra Sarda e tutte le altre razze; questo risultato è in contrasto con quanto osservato per le distanze  $F_{ST}$  che hanno evidenziato la Sarda, come la razza più differenziata. Considerando che il molecular coancestry tra-popolazioni evidenzerebbe le relazioni genetiche tra-razze al momento della separazione (Alvarez et al., 2005), si potrebbe supporre che la razza Sarda potrebbe essere considerata come una reliquia della popolazione ovina ancestrale prima della separazione delle razze e questo potrebbe essere coerente con la storia filogeografica di questa razza autoctona insulare; inoltre,

l'isolamento di lunga durata vissuta da questa razza può anche spiegare la più alta differenziazione evidenziata utilizzando la misura di distanza ( $F_{ST}$ ), fortemente dipendente dalle frequenze alleliche osservate, che a loro volta sono fortemente dipendenti dai processi evolutivi recenti, come la deriva genetica.

### 16.3 Similarità genetiche

Dai genotipi multilocus individuali, in base al numero di alleli condivisi tra soggetti o tra razze, sono state calcolate le similarità genetiche i cui risultati sono riportati in tabella 20.

**Tabella 20** Similarità genetiche intra razza

Razza	Average values	DevSt	Range	
			Min	Max
Bagnolese	0,315	0,085	0,026	0,947
Laticauda	0,332	0,079	0,105	0,947
Comisana	0,331	0,079	0,105	0,684
Sarda	0,405	0,085	0,132	0,947
Gentile di Puglia	0,293	0,079	0,053	0,684
Altamura	0,338	0,089	0,026	0,816
Leccese	0,296	0,091	0,053	0,711

Anche le similarità genetiche confermano i risultati ottenuti con gli altre metodiche statistiche. I valori di similarità variano da un minimo di 0,293 per la Gentile di Puglia, che evidenzia quindi la maggiore variabilità genetica, ad un massimo di 0,405 nella Sarda, che conferma la sua omogeneità genetica dei soggetti analizzati.

In Tabella 21 vengono riportate le similarità tra razze. I valori maggiori si osservano tra Sarda vs Comisana (0,310), vs Bagnolese (0,299) e vs Laticauda (0,286).

Anche la Bagnolese e la Laticauda hanno fatto registrare un elevato valore di similarità genetica (0,304) e questo è ascrivibile essenzialmente al fatto che ambedue le razze sembra

abbiano avuto la stessa origine, ovvero dalla pecora nord africana Barbaresca.

Il valore più basso di similarità genetica tra razze si è osservato invece tra Leccese e Laticauda (0,254), confermando la bassa identità genetica esistente tra queste due razze.

**Tabella 21** Similarità tra le razze italiane

Razza	1	2	3	4	5	6	7
1. Bagnolese							
2. Laticauda	0,304						
3. Comisana	0,294	0,281					
4. Sarda	0,299	0,286	0,310				
5. Gentile di Puglia	0,262	0,261	0,262	0,261			
6. Altamurana	0,266	0,269	0,274	0,276	0,278		
7. Leccese	0,262	0,254	0,270	0,266	0,262	0,283	

## 17 Test di assegnazione razziale

### 17.1 Approccio di likelihood e analisi di potenza

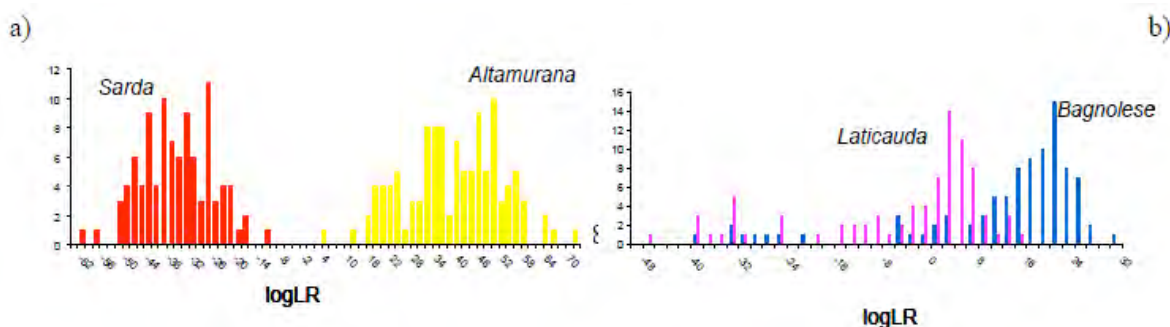
Adottando un approccio di *maximum likelihood* per il campione relativo alla popolazione complessiva, costituito dai dati genotipici ottenuti analizzando 19 marcatori STR, tutti i soggetti di razza Sarda (N=99) sono assegnati correttamente alla razza d'origine e per tutte le altre sottopopolazioni le percentuali di corretta assegnazione superano il 98% (tabella 22). Tali valori si discostano da quanto osservato analizzando gli stessi campioni con il *panel* dei 104 marcatori SNP. In tal caso, infatti, le percentuali più basse di corretta assegnazione, che si osservano per le sottopopolazioni Comisana e Laticauda, assumono valori, rispettivamente, pari al 70,2% e al 58,6%, mentre le percentuali più alte di corretta assegnazione, che si osservano per le sottopopolazioni Altamurana e Sarda assumono valori, rispettivamente, pari al 96,5% e al 98,8% (tabella 22).

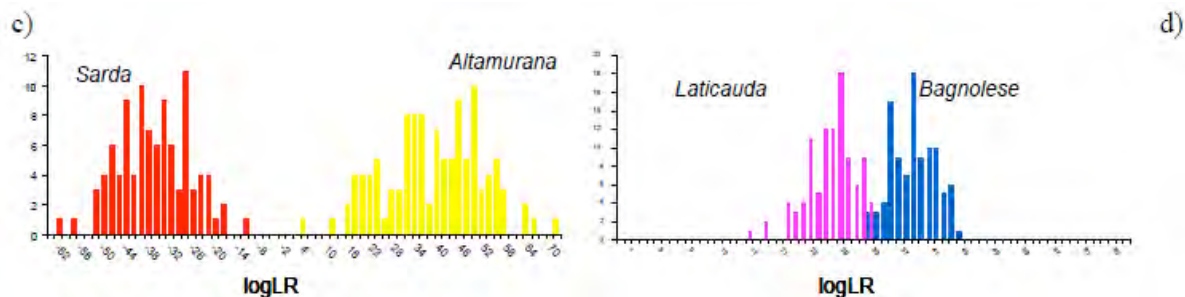
**Tabella 22** Percentuali di corretta attribuzione dei soggetti nelle diverse razze.

RAZZA	Dimensione campione	% Corretta attribuzione con marcatori SNP	% Corretta attribuzione con marcatori STR
Altamurana	114	96,50%	99,70%
Bagnolese	93	86,90%	98,40%
Comisana	96	70,20%	99,90%
Gentile di Puglia	108	95,50%	99,90%
Lauticauda	100	58,60%	99,60%
Leccese	133	94,70%	99,40%
Sarda	99	98,80%	100,00%

Per ciascuna possibile coppia di razze, utilizzando i valori di *log-likelihood* dei soggetti appartenenti alle due razze di appartenere ad ognuna delle due razze, sono stati calcolati i valori di *log-likelihood ratio* (logLR). A titolo esemplificativo, sono riportati, in figura 8, i *plot* relativi ai valori di *log-likelihood ratio* (logLR) ottenuti mediante analisi con loci STR per le coppie Altamurana vs Sarda (Figura 8a) e Bagnolese vs Laticauda (Figura 8b), nonché i *plot* relativi ai valori di logLR ottenuti mediante analisi con loci SNP per le coppie Altamurana vs Sarda (Figura 8c) e Bagnolese vs Laticauda (Figura 8d). Previa verifica dell'ipotesi di normalità dei dati (*test di Kolmogorov-Smirnov*), per ciascuna coppia di razze, media e deviazione standard delle distribuzioni di logLR osservate (sia con i loci SNP che con i loci STR) sono state utilizzate per ottenere le proporzioni di falsi positivi ( $\alpha$ ) e di veri positivi ( $1 - \beta$ ) a diversi valori di logLR.

**Figura 8** Grafici dei valori di *log-likelihood ratio* ottenuti mediante analisi con loci STR per le coppie Altamurana vs Sarda (a) e Bagnolese Laticauda (b) ed ottenuti mediante analisi con loci SNP per le coppie Altamurana Sarda (c) e Bagnolese Laticauda (d) (continua).





A partire da tali valori, la probabilità *a posteriori*  $\Pr(\text{razza}J)$  che un individuo origini dalla razza  $J$ , data l'ipotesi alternativa che origini dalla razza  $K$  e dato il rapporto  $\gamma = (1 - \beta)/\alpha$ , è stata calcolata come  $\Pr(\text{razza}J) = \gamma/(\gamma + 1)$ , che assume *a priori* uguali (Weir, 1996). A titolo esemplificativo, in tabella 23 sono mostrate, per ciascuno dei tre valori soglia di  $\log LR$  (0, 1 e 2) arbitrariamente adottati, le proporzioni di falsi positivi e di veri positivi per i confronti Altamurana vs Sarda e Bagnolese vs Laticauda nell'analisi condotta con loci STR. La tabella mostra anche i valori della probabilità *a posteriori* che ogni soggetto con  $\log LR$  maggiore rispetto al valore soglia considerato derivi dalla razza presunta, assumendo una uguale probabilità *a priori* per le due razze.

**Tabella 23** Analisi della potenza del test di assegnazione razziale con i marcatori STR.

Test value of logLR	True positive	False positive	Probability	True positive	False positive	Probability
	<b>Altamurana vs Sarda</b>			<b>Bagnolese vs Laticauda</b>		
0	0,9990	0,0001	0,9999	0,9695	0,0375	0,9628
1	0,9987	0,0001	0,9999	0,9557	0,0265	0,9730
2	0,9984	0,0000	1,0000	0,9372	0,0183	0,9808

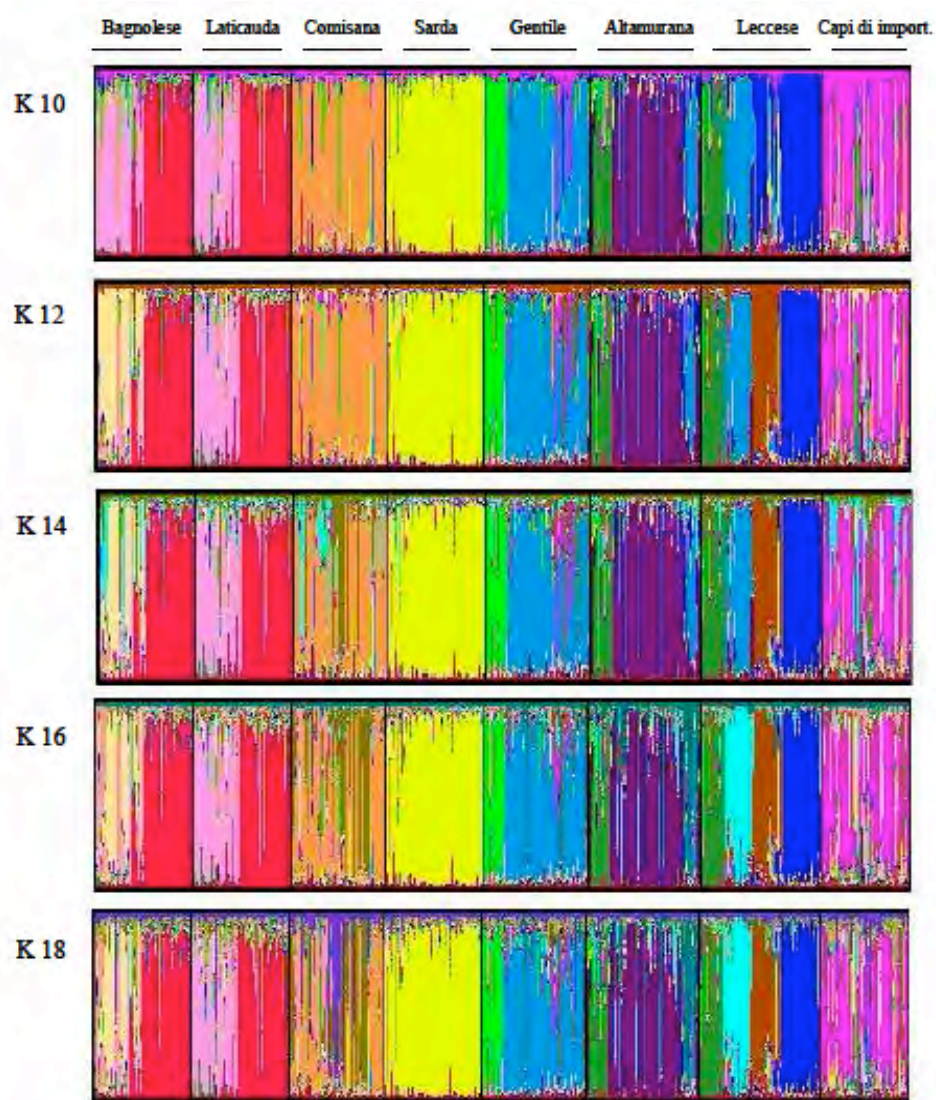
Come è possibile osservare dai dati riportati nella figura 8 e nelle tabelle 22 e 23, i risultati ottenuti con l'impiego di loci STR e SNP sono, grosso modo, confrontabili per la coppia di razze geneticamente più differenziata (Altamurana e Sarda), mentre i loci STR mostrano di avere una *performance* migliore rispetto ai loci SNP per la coppia di razze campane, risultate geneticamente più vicine anche sulla base dei valori di *pair-wise*  $F_{ST}$ . Tale maggiore similarità genetica per Bagnolese e Laticauda è, peraltro, coerente con la storia di queste due razze, entrambe derivate, secondo le ipotesi più accreditate, da incroci delle popolazioni



locali con arieti di razza Barbaresca. Tra i possibili obiettivi della tracciabilità razziale della carne ovina, accanto a quello di difendere le produzioni delle razze autoctone da quelle ottenibili da razze nazionali a maggiore diffusione, quali la Sarda e la Comisana, vi è anche, e soprattutto, la necessità di difendere le produzioni delle razze autoctone da eventuali aggressioni sleali da parte del mercato estero. A tal fine, abbiamo valutato la possibilità di campionare, direttamente presso le strutture locali di macellazione, campioni biologici di soggetti di importazione destinati alla macellazione ed alla commercializzazione sul territorio nazionale. Complessivamente, sono stati campionati 90 capi, provenienti da diversi paesi europei (Francia, Spagna, Ungheria, Romania) o di provenienza ignota, che sono stati genotipizzati sia con il panel di 19 loci STR che con quello di 104 loci SNP.

La documentazione ufficiale di accompagnamento dei suddetti soggetti non riportava l'indicazione della tipologia genetica di appartenenza; in mancanza di tale informazione, si è deciso in una prima fase del lavoro, di optare per una analisi di tipo esplorativo, utilizzando, per l'assegnazione razziale, l'algoritmo di tipo bayesiano implementato nel software "Structure". Il software "Structure" ricorre a simulazioni che prevedono l'uso di metodi Monte Carlo basati su catene di Markov. Riportiamo, in figura 9, i risultati di tale analisi condotta sul dataset complessivo (comprendente le sette razze ed i capi di importazione) per valori di K compresi tra 10 e 20 e la lunghezza della catena di Markov è stata impostata pari a 300.000 step. Nonostante i valori estremamente conservativi, l'analisi è stata ripetuta in triplicato per verificare la riproducibilità dei risultati. Come è possibile notare, per tutti i valori di K testati, la strutturazione della popolazione conserva grosso modo lo stesso andamento ed emerge che i soggetti appartenenti ai capi di importazione vengono, a qualsiasi valore di K, attribuiti ad un cluster distinto da tutte le altre razze.

**Figura 9** Rappresentazione grafica relativa ai risultati dell'analisi della struttura genetica della popolazione complessiva, comprensiva dei soggetti di importazione, effettuata con il software "Structure" per i loci STR.



Al fine di determinare l'appartenenza o meno di un determinato campione biologico ad una specifica razza, è stata utilizzata la funzione di Tracciabilità Razziale implementata nel Software "TraceDNA".

Il Software ha confrontato i genotipi multilocus ottenuti dai campioni biologici dei prodotti commercializzati prelevati sul mercato, con i genotipi multilocus delle razze presenti nel database oggetto di confronto. In figura 10 si riporta a titolo esemplificativo un file di output del Software riguardante l'attribuzione di identità razziale dei Capi di importazione

provenienti dalla Romania. Possiamo notare che il Software riconosce nel soggetto V2802 la razza Laticauda, nel soggetto V2804 la Comisana e nel soggetto V2806 la Bagnolese. Per quanto riguarda i Capi di importazione provenienti dalla Spagna, Ungheria e Agnelli trimeticci, il Software non ha attribuito questi soggetti ad alcuna delle razze pure presenti nel database; mentre ha riconosciuto come pecore Comisane alcuni dei soggetti presenti nel gruppo delle Merinizzate e Guazzabuglio.

**Figura 10** Risultato di Attribuzione di Identità Razziale per i Capi di importazione provenienti dalla Romania

Campione	V2805TEST	
razza	-78,03924424	Leccese
razza	-93,06991151	Altamura
razza	-64,28024345	Capi importazione Romania
razza	-76,10302345	Sarda
razza	-80,05473186	Capi importazione Spagna
Campione	V2802TEST	
razza	-64,93766817	Capi importazione Romania
razza	-58,4713582	Merinizzate
razza	-58,12356547	Laticauda
razza	-65,74419031	Sarda
razza	-59,45667307	Comisana
razza	-66,36230049	Altamura
Campione	V2804TEST	
razza	-70,69617389	Laticauda
razza	-76,25011641	Leccese
razza	-69,23132385	Comisana
razza	-81,11127848	Capi importazione Spagna
razza	-78,97838756	Altamura
razza	-69,96181223	Bagnolese
razza	-74,38366529	Guazzabuglio
Campione	V2806TEST	
razza	-67,84707512	Altamura
razza	-77,42949458	Capi importazione Ungheria
razza	-62,46343982	Bagnolese
razza	-64,77848672	Agnelli Trimeticci
razza	-64,25870468	Sarda

Questo risultato è incoraggiante, ed al fine di saggiarne la solidità e la conseguente applicabilità all'interno di una filiera alimentare, si sono rese indispensabili verifiche formali e statistiche. La verifica di primo tipo ha riguardato l'impianto dell'analisi stessa, ovvero se fosse corretto considerare i soggetti delle razze che compongono l'intero database nel calcolo delle frequenze alleliche, preliminarmente all'analisi della likelihood ratio.

A questo scopo il nuovo criterio è stato quello di non considerare per il calcolo delle frequenze alleliche 5 soggetti per ciascuna delle razze pure e tutto il gruppo dei 90 soggetti prodotti di incrocio. La verifica di secondo tipo è consistita nell'implementazione all'interno

del software “TraceDNA” del procedimento “Leave One Out”. Tale procedimento, a partire da un file costruito con i criteri sopra esplicitati, processa i soggetti esclusi dal datafile per il calcolo delle frequenze alleliche, in modo tale da considerarli come elementi nuovi di cui non si ha alcuna informazione. Il procedimento “Leave One Out” assegna ciascun individuo ad una razza definita, con un preciso valore di likelihood. I risultati ottenuti sono incoraggianti per i 5 soggetti appartenenti alle razze pure, che vengono tutti correttamente attribuiti alle reali razze d’origine. I prodotti di incrocio non hanno nel datafile un gruppo etnico di riferimento, quindi ciascun capo è stato assegnato ad una delle razze pure presenti nel database, con diversi valore di likelihood che devono essere confrontati con i valori di probabilità che tutti i soggetti delle razze pure hanno di appartenere realmente alla propria razza d’origine. Se la probabilità del singolo soggetto di incrocio di appartenere ad una data razza pura è inferiore alla probabilità presentata dai soggetti puri di appartenere alla propria razza reale, possiamo ipotizzare che il soggetto prodotto di incrocio non appartenga a quella razza. I risultati ottenuti ad oggi con il lavoro di tesi impongono ulteriori analisi di conferma con test statistici mirati, come ad esempio il test di Kruskal-Wallis (Kruskal W.H. W.A. and Wallis, 1952), un metodo non parametrico per verificare l’uguaglianza delle mediane di diversi gruppi al fine di verificare che tali gruppi provengano da una stessa popolazione o da popolazioni con uguale mediana.

Il software Arlequin non può essere utilizzato direttamente ai fini della tracciabilità dei prodotti di incrocio, se non fornendogli come input il datafile costruito per eseguire il procedimento “Leave One Out”. Inoltre il software Arlequin necessiterebbe di implementare il confronto tra le likelihood dei soggetti di incrocio e le likelihood dei soggetti puri, operazione non fattibile su questo software, mentre è stato implementato nel software “TraceDNA” con lo scopo di ottimizzare e velocizzare le analisi. I risultati ottenuti finora sulle razze Gentile di Puglia e Sarda non ci permettono comunque di differenziare con un buon tasso di attendibilità tutto il pool di soggetti meticci da queste due razze pure. Abbiamo necessità di studiare ulteriormente il problema che non può essere completamente risolto nelle tempistiche di questa tesi di dottorato.

## **18 Scelta dei marcatori più informativi**

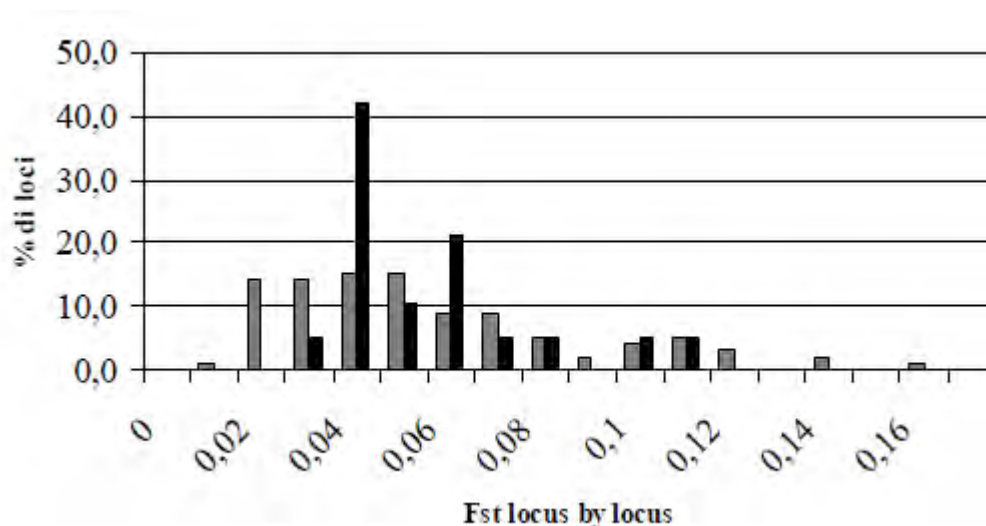
### *18.1 Test sequenziale*

Al fine di valutare la possibilità di ridurre tempi e costi di analisi e favorire, quindi, la eventuale trasferibilità operativa della metodica di tracciabilità razziale in filiere controllate

di produzione e commercializzazione della carne ovina, è stato adottato un approccio del tipo “test sequenziale” (genotipizzazione sequenziale con sub-set di marcatori); per motivi di brevità, si riportano in questa sede soltanto i risultati ottenuti con i migliori sub-set per ciascuna tipologia di marcatori. A tal fine, si è proceduto a selezionare, dal panel dei 19 loci STR e dei 104 loci SNP, due subset (uno per ciascuna tipologia di marcatori) grosso modo corrispondenti ad un terzo dei loci complessivamente utilizzati nelle indagini precedentemente discusse. Quale parametro di scelta è stato adottato l’indice  $F_{ST}$  locus by locus ottenuto, per i 19 loci STR e per i 104 loci SNP, utilizzando il software Arlequin v. 3.11. I valori di  $F_{ST}$  sono risultati altamente significativi ( $p > 0,01$ ) per tutti i loci analizzati e variavano tra 0,028 e 0,105 per i loci STR (valore medio  $0,05 \pm 0,021$ ) e tra -0,003 e 0,160 per i loci SNP (valore medio  $0,086 \pm 0,026$ ). In Figura 11 sono riportate le distribuzioni dei valori di  $F_{ST}$  per i panel complessivi di ciascuna delle due tipologie di marcatori.

Come si può osservare, mediamente i loci SNP hanno mostrato valori di  $F_{ST}$  più contenuti rispetto ai loci STR, sebbene i valori più alti siano stati osservati proprio per tale tipologia di marcatori. I risultati ottenuti appaiono in linea con quanto riportato da Glover et al. (2010) che hanno stimato valori di  $F_{ST}$  compresi tra 0,033 e 0,115 e tra -0,002 e 0,316, rispettivamente, per 14 loci STR e 300 loci SNP.

**Figura 11** Distribuzione dei valori di  $F_{ST}$  locus by locus per i loci STR (in nero) e per i loci SNP (in grigio).



Il subset dei loci STR scelti sulla base dei valori di  $F_{ST}$  locus by locus risulta composto dai marcatori: OarVH72, OarFCB193, OarFCB304, OarAE129, BM1824, OarFCB128 e MAF33.

## 19 Test di attribuzione razziale eseguito con un subset di marcatori

Il test di assegnazione razziale mediante approccio di *likelihood* implementato nel *software Arlequin v. 3.11* e la successiva analisi di potenza, sono state, quindi, ripetute, per ciascuna possibile coppia di razze, adottando tali *subset* di marcatori. Come atteso, l'*overlapping* tra le distribuzioni di *logLikelihood ratio* per le diverse coppie di razze aumenta passando da valori più alti di  $F_{ST}$  locus by locus a valori più bassi, e ciò maggiormente per le razze meno differenziate rispetto a quelle più differenziate. A mò di esempio, riportiamo nella tabella 24 i risultati dell'analisi di potenza del test di assegnazione razziale effettuato con il *subset* di marcatori (7 loci STR) scelti tra i più informativi ( $F_{ST}$  locus by locus > 0,05). Un primo risultato interessante è dato dal fatto che, anche per le razze meno differenziate (Laticauda e Bagnolese), utilizzando soltanto sette loci STR è possibile ancora avere una percentuale di corretta attribuzione superiore al 95% in corrispondenza di un valore di *loglikelihood ratio* pari a 2, valore in corrispondenza del quale la proporzione di falsi positivi, ovvero l'errore di tipo I, rimane comunque contenuta al di sotto del 5%.

**Tabella 24** Analisi della potenza del test di assegnazione razziale con i sette marcatori STR maggiormente informativi ( $F_{ST}$  locus by locus > 0,05).

<i>Test value of logLR</i>	<i>True positive</i>	<i>False positive</i>	<i>Probability</i>	<i>True positive</i>	<i>False positive</i>	<i>Probability</i>
	Altamurana vs Sarda			Bagnolese vs Laticauda		
0	0,9801	0,0008	0,9992	0,8586	0,1260	0,8720
1	0,9732	0,0048	0,9951	0,8009	0,0684	0,9213
2	0,9643	0,0029	0,9970	0,7309	0,0337	0,9559

Dai risultati è possibile dedurre che la potenza di assegnazione razziale ottenuta sia con l'impiego di sette loci STR che utilizzando trentacinque loci SNP (selezionati tra i più

informativi) continua ad essere confrontabile, per lo meno per la coppia di razze geneticamente più differenziata (Altamurana e Sarda), con una percentuale di corretta attribuzione superiore, per entrambe le tipologie di marcatori ed in corrispondenza di un valore di *loglikelihood ratio* pari a due, al 99%.

Tuttavia, per la coppia di razze geneticamente meno differenziate (Laticauda e Bagnolese), il subset dei loci STR ha mostrato di fornire una *performance* migliore (corretta attribuzione > 95%) rispetto al subset dei loci SNP (corretta attribuzione > 74%).

## 20 Analisi di polimorfismo ai geni di colorazione del mantello

I risultati delle analisi effettuate su un totale di 35 animali, 5 soggetti per ognuna delle 7 razze oggetto di studio, vengono illustrati nella tabella 25.

I dati evidenziati in arancione sono relativi ai polimorfismi osservati solo in alcuni dei cinque campioni testati per le razze Bagnolese e Comisana. Tali risultati richiedono una ulteriore conferma su un numero maggiore di soggetti, per poter valutare se la frequenza di mutazione è significativa ai fini della tracciabilità di razza effettuata mediante metodo deterministico.

I dati in verde risultano particolarmente interessanti in quanto evidenziano mutazioni private di razza e quindi, potenzialmente, di interesse ai termini della tracciabilità razziale.

**Tabella 25**

BREED	MC1R	SILVER EXON6	SILVER EXON7	SILVER EXON8	SILVER EXON9
SARDA	A12G - C471T - T642G - C777T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
COMISANA	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification
GENTILE PUGLIA	A12G - C471T - T642G - C777T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
LECCESE	A12G - C471T - T642G - C777T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
ALTAMURANA	A12G - C471T - T642G - C777T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
BAGNOLESE	A12G - C471T - T642G - C777T	C424A	No Mutations	No Mutations	No Mutations
LATICAUDA	A12G - C471T - T642G - C777T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations

BREED	SILVER EXON10	ASIP EXON2	ASIP EXON3	ASIP EXON4	TYROSINASE EXON1
SARDA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Bad sequence	G192C - C462T
COMISANA	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification
GENTILE PUGLIA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Bad sequence	G192C - C462T
LECCESE	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Bad sequence	G192C - C462T
ALTAMURANA	No Mutations	5bp deletion	No Mutations	G138A - C142T - C252T - A359G	G192C - C462T
BAGNOLESE	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Bad sequence	G192C - C462T
LATICAUDA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Bad sequence	G192C - C462T

BREED	TYRP1 EXON1	TYRP1 EXON2	TYRP1 EXON3	TYRP1 EXON4	TYRP1 EXON5
SARDA	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
COMISANA	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	C98T	Problems of amplification
GENTILE PUGLIA	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
LECCESE	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
ALTAMURANA	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
BAGNOLESE	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations
LATICAUDA	C203T	No Mutations	No Mutations	No Mutations	No Mutations

BREED	TYRP1 EXON6	TYRP1 EXON7	TYRP2 EXON1	TYRP2 EXON2	TYRP2 EXON3
SARDA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Dirty Sequence	No Mutations
COMISANA	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification
GENTILE PUGLIA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Dirty Sequence	No Mutations
LECCESE	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Dirty Sequence	No Mutations
ALTAMURANA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Dirty Sequence	G83A
BAGNOLESE	T29C	No Mutations	No Mutations	T42C	No Mutations
LATICAUDA	No Mutations	No Mutations	No Mutations	Dirty Sequence	No Mutations

BREED	TYRP2 EXON4	TYRP2 EXON5	TYRP2 EXON6	TYRP2 EXON7	TYRP2 EXON8
SARDA	Dirty Sequence	G124A - G140A	Dirty Sequence	No Mutations	C185A
COMISANA	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification	Problems of amplification
GENTILE PUGLIA	Dirty Sequence	Dirty Sequence	Dirty Sequence	No Mutations	C185A
LECCESE	Dirty Sequence	Dirty Sequence	Dirty Sequence	G230A	C185A
ALTAMURANA	Dirty Sequence	Dirty Sequence	Dirty Sequence	No Mutations	C185A
BAGNOLESE	Dirty Sequence	Dirty Sequence	Dirty Sequence	No Mutations	C185A
LATICAUDA	Dirty Sequence	Dirty Sequence	Dirty Sequence	No Mutations	C185A

Per la razza Comisana ci sono stati, in generale, problemi di amplificazione, dovuti forse ad una cattiva qualità del DNA. Non è stato possibile quindi ottenere risultati per questa razza, tranne che per la mutazione C98T identificata nell'esone 4 di *TYRP1*, che potrebbe però rappresentare un segnale spurio di mutazione.

Per quanto riguarda il gene *MC1R* sono state trovate le mutazioni evidenziate in tabella 25, di cui anche la mutazione silente A12G identificata da Deng WD et al. nel 2007 nelle pecore Black-boned, nelle pecore indigene del Nanping e nelle Romney Marsh per spiegare le cause della pigmentazione scura del mantello.

Dal momento che questi polimorfismi sono presenti in tutte le razze analizzate, non permettono di discriminare una razza dall'altra e quindi non sono utili ai fini della tracciabilità razziale.

Lo stesso discorso vale per la sostituzione missenso C203T trovata nell'esone 1 di *TYRP1* ed identificata anche da Deng WD et al. nel 2006, per la mutazione C185A trovata nell'esone 8 di *TYRP2*, per le mutazioni G192C e C462T trovate nell'esone 1 di *TYR* ed identificate anche da Deng WD et al. nel 2007 nelle pecore Black-boned, nelle pecore del Nanping e nelle Romney Marsh per la ricerca di mutazioni causa del colore del mantello.

Inoltre, non è stato possibile ottenere sequenze pulite e leggibili degli esoni 2 – 4 – 5 – 6 di *TYRP2*, a causa forse di problemi nel sequenziamento: sarebbe opportuno quindi ripetere



queste analisi in un secondo momento, come anche per i primi cinque esoni del gene *SILVER*, per cui il mancato funzionamento dei primers non ne ha permesso l'amplificazione né l'analisi. In generale non sono state trovate mutazioni in *SILVER*, eccetto la sostituzione C424A nell'esone 6, presente solamente in alcuni soggetti di Bagnolese, e che necessita quindi di un'ulteriore conferma su un numero maggiore di soggetti.

Per quanto riguarda il gene *ASIP*, sono state trovate mutazioni significative nell'esone 4 esclusivamente nella razza Altamurana e la delezione di 5-bp nell'esone 2, identificata anche da Royo et al nel 2008 per la formazione del colore nero nella razza Xalda: sono mutazioni particolarmente interessanti in quanto risultano, in questa fase preliminare, mutazioni private di razza e quindi, potenzialmente, di interesse in termini di tracciabilità razziale. Lo stesso discorso vale per le mutazioni G83A nell'esone 3 di *TYRP2* identificata esclusivamente in Altamurana, G124A e G140A nell'esone 5 di *TYRP2* trovate solamente nella razza Sarda e la mutazione G230A nell'esone 7 di *TYRP2* trovata solo nella Leccese. Queste mutazioni non sono mai state descritte prima d'ora; tuttavia, lo scarso numero di soggetti genotipizzati impone prudenza nell'interpretazione dei risultati e suggerisce la necessità di approfondire lo screening genetico ampliando il numero di soggetti analizzati.

Quindi, previo studio di un numero adeguato di soggetti, le mutazioni evidenziate in verde in tabella 25, potrebbero essere proposte come marcatori specifici di razza, se confermate in altri animali di queste razze ed assenti nelle altre.

L'analisi di cinque soggetti per razza costituisce esclusivamente un'indicazione preliminare, in quanto non è possibile escludere che un polimorfismo ritrovato in una razza sia presente a minor frequenza anche nelle altre o sia presente solo in alcuni soggetti della razza coinvolta e non in tutti. Rappresenta comunque un'analisi di partenza per la ricerca di una mutazione specifica di razza, vale a dire presente nella totalità dei soggetti di un'unica razza.

## CONCLUSIONI

Il lavoro oggetto della presente tesi si è proposto di offrire un contributo scientifico alla tutela delle carni ovine prodotte dalle razze autoctone dell'Italia Meridionale Continentale, assicurandone la riconoscibilità mediante metodologie molecolari per valorizzarne l'immagine e difenderne il valore aggiunto legato alle tecnologie tradizionali compatibili con la cultura aziendale e con lo sviluppo eco-sostenibile delle aree difficili. Più in particolare, l'obiettivo del lavoro di tesi è stato quello di implementare una metodica di rintracciabilità genomica della carne ovina che fosse efficace e sicura, in grado di essere competitiva sul mercato, basata sulla tipizzazione di marcatori genetici a partire da tessuti o tagli di carne, prelevati nei diversi livelli della filiera produttiva e distributiva. I risultati ottenuti hanno contribuito alla messa a punto di un procedimento di protezione della carne ovina italiana integrando un sistema di certificazione e di controllo dei processi e dei prodotti mediante metodologie genomiche per la rintracciabilità delle razze allo studio.

La tipologia tradizionale dell'allevamento delle razze autoctone non prevede forti input tecnologici ma consente di realizzare obiettivi qualitativi di alto pregio. Le produzioni e la loro trasformazione sono ancora spesso vincolate agli schemi tradizionali che, se da una parte ne garantiscono la tipicità, dall'altra creano preoccupazioni negli allevatori per la concorrenza dei prodotti a più basso costo. La competitività può essere ripristinata mediante una migliore qualificazione delle produzioni che porti ad una loro più elevata valutazione sui mercati. Nuove opportunità, per le razze oggetto di questa tesi, possono essere create dall'attenzione dei mercati ai prodotti con caratteristiche di qualità e tipicità, protetti dalla diffusione di marchi e sistemi di certificazione volontaria di processo e di prodotto e, non ultimo, dalla disponibilità di metodologie di analisi per la garanzia delle certificazioni, come la tracciabilità.

### *La Caratterizzazione Genetica delle Razze ovine autoctone dell'Italia Meridionale Continentale*

La caratterizzazione genetica delle popolazioni ovine autoctone dell'Italia Meridionale Continentale, oggetto di questa tesi di dottorato, ha costituito il punto di partenza e gettato le basi per il lavoro di tracciabilità razziale. L'analisi dei risultati dimostra che le informazioni ottenute dallo studio della variabilità genetica, effettuata con marcatori genomici STR e SNP, sono fondamentali ai fini della pianificazione di interventi di recupero del patrimonio genetico autoctono della specie ovina.

La presenza di livelli di variabilità genetica residua evidenziata in tutte le razze autoctone dell'Italia Meridionale ed, in particolare, nelle razze Altamurana e Leccese, lascia margine per interventi di recupero; ne sono risultati testimoni i valori di ricchezza allelica e di eterozigosità osservata ai loci STR ed oggi confermata anche dai loci SNP, risultati sostanzialmente confrontabili con quanto osservato in letteratura per altre razze europee non necessariamente a rischio di estinzione.

Le stesse informazioni molecolari ottenute con l'analisi della variabilità genetica delle popolazioni allo studio, sono state vantaggiosamente utilizzate per interventi di salvaguardia attiva delle popolazioni stesse, attraverso strategie di valorizzazione economica e commerciale delle produzioni primarie che da esse è possibile ottenere, con particolare riferimento, in questo contesto, alla produzione della carne ed alla possibilità di tracciare o rintracciare il prodotto in ciascun passaggio lungo l'intera filiera.

#### *La Tracciabilità Dei Prodotti Carnei*

La genomica costituisce un approccio insostituibile per la realizzazione di un modello molecolare di rintracciabilità atto a garantire l'identità individuale e razziale delle diverse produzioni primarie di origine animale lungo tutto il percorso della filiera produttiva tradizionale fornendo una metodica innovativa per la tutela dei prodotti monorazza relativi alle produzioni carnee tradizionali e tipiche.

#### *Metodo deterministico*

La tesi si è posta l'obiettivo di dare un contributo all'identificazione razziale dei prodotti carnei attraverso l'analisi dei polimorfismi dei geni alla base della colorazione del mantello, essendo quest'ultima una caratteristica fortemente soggetta a selezione e da sempre considerata tipica di razza. La metodica si basa sulla ricerca di mutazioni caratteristiche di razza, e può essere efficacemente utilizzata nell'attribuzione razziale dei prodotti carnei dei tipi genetici in cui tali mutazioni vengano evidenziate, attraverso la possibilità di eseguire un test rapido in grado di assegnare un prodotto alla razza d'appartenenza in modo certo. Questa parte del lavoro di tesi è stata svolta presso il Laboratorio di Biotecnologie della Facoltà di Scienze e Tecniche dell'Università di Limoges, in Francia. L'equipe che si occupa dell'argomento ha esperienza pluriennale in questo campo della ricerca e la collaborazione ha permesso un lavoro integrato in grado di unire le conoscenze relative a più razze, principalmente protagoniste del mercato carneo.

I risultati ottenuti dallo studio del polimorfismo dei geni: MC1R, TYR, TYRP1, DCT, ASIP e SILVER, mettono in evidenza la presenza di alcune peculiarità relative alle razze Sarda, Leccese e Altamurana, che incoraggiano ad approfondire queste analisi ed indicano una strada da percorrere nella ricerca di caratteri distintivi di razza, al fine di ottimizzare un test di tracciabilità in grado di affiancare la metodica messa a punto con i marcatori genomici STR in questo lavoro di tesi. Ad oggi dunque, questa metodica non è ancora disponibile e spendibile sul mercato, in quanto la ricerca delle mutazioni private è solamente ad uno stadio preliminare.

#### *Metodo probabilistico*

Per rendere operativo il sistema di rintracciabilità delle carni ovine sono state studiate le procedure di implementazione dei marcatori STR necessari alla formulazione dei profili genomici di ciascun tipo genetico. L'archivio di dati molecolari realizzato con il lavoro di tesi favorirà il trasferimento operativo del know-how necessario all'identificazione ed al controllo dell'origine delle carni.

I test di assegnazione razziale condotti, si sono rivelati, in condizioni sperimentali, in grado di discriminare, in modo molto efficace, le razze autoctone dalle razze nazionali a maggiore diffusione ed hanno consentito di mettere in evidenza, anche se in modo preliminare, la possibilità di salvaguardare le razze autoctone dai capi di importazione di origine razziale ignota, dai soggetti meticcii di provenienza nazionale e da prodotti di incrocio provenienti da zone di vendita diverse, che comunemente si trovano in commercio in periodi stagionali di massima richiesta del mercato.

I risultati ottenuti nelle condizioni sperimentali, accompagnati alla ancora notevole scarsità di studi sull'argomento, suggeriscono che, nonostante gli sforzi ormai generalizzati, almeno nel breve periodo, i marcatori di elezione per applicazioni quali la tracciabilità razziale, continueranno ad essere, anche per la specie ovina, i marcatori genomici STR, nonostante la complessità dei procedimenti di categorizzazione del dato grezzo ed il rilevamento di alleli nulli, la cui presenza è stata dimostrata anche per alcuni dei loci STR adottati in questo lavoro di tesi. Una spinta nella direzione di una progressiva sostituzione dei loci STR con i più attuali marcatori SNP potrebbe venire proprio dai risultati che si stanno progressivamente accumulando nel contesto del progetto Italian Sheep Hap Map al quale questo lavoro di tesi ha contribuito con i risultati del progetto di ricerca TR.OVI.GEN.

Al fine di favorire la trasferibilità operativa delle metodiche di genetica molecolare nei processi di tracciabilità razziale, è stata valutata la possibilità di ridurre progressivamente il

numero di loci STR da analizzare, per contenere, al contempo, costi e tempi di analisi, senza dover eccessivamente sacrificare la potenza del test di assegnazione razziale. I risultati ottenuti incoraggiano in tal senso e lasciano intravedere realisticamente la possibilità di implementazione operativa dei test di assegnazione razziale, sebbene permangano ancora alcune difficoltà logistico-operative di campo, principalmente ascrivibili a disorganizzazione e frammentazione della filiera alimentare ed a mancanza di coesione, sia orizzontale che verticale, tra i diversi operatori coinvolti.

I test di assegnazione razziale, condotti nel lavoro di tesi, hanno consentito di mettere in evidenza la possibilità di salvaguardare le produzioni ovine delle razze autoctone dell'Italia Meridionale Continentale da possibili aggressioni sleali da parte di capi provenienti dai mercati esteri.

Al fine di saggiare ulteriormente la solidità e la conseguente applicabilità della metodica di tracciabilità razziale basata sull'impiego dei marcatori genomici STR all'interno di una filiera alimentare, si prevedono sviluppi futuri del lavoro che riguardano, in particolare, un'ulteriore e più approfondita analisi della potenza statistica dei test alla base della metodica, attraverso l'utilizzo di nuovi algoritmi e software mirati.

Il lavoro di tesi ha costituito un buon passo nella direzione giusta per avviare il trasferimento in campo della metodologia di Assegnazione Razziale di un prodotto carneo ed ha dimostrato che le informazioni ottenute dall'analisi della variabilità genetica effettuata mediante marcatori molecolari STR possono essere utili per tracciare o rintracciare il prodotto in ciascun passaggio lungo l'intera filiera alimentare.

## BIBLIOGRAFIA

- Alvarez I, Royo LJ, Fernández I, Gutiérrez JP, Gómez E, Goyache F. (2004) Genetic relationships and admixture among sheep breeds from Northern Spain assessed using microsatellites. *J Anim Sci.* 82(8):2246-52.
- Alvarez I, Gutiérrez JP, Royo LJ, Fernández I, Gómez E, Arranz JJ, Goyache F. (2005) Testing the usefulness of the molecular coancestry information to assess genetic relationships in livestock using a set of Spanish sheep breeds. *J Anim Sci.* Apr;83(4):737-44.
- Amos, W., S. J. Sawcer, R. Feakes, and D. C. Rubinsztein. (1996) Microsatellites show mutational bias and heterozygote instability. *Nature Genet.* 13:390–391.
- Anderson, D. E. (1991). Genetic study of eye cancer in cattle. *J. Heredity* 82:21-26.
- Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F. (1998) Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim Genet.* 29(6):435-40.
- Badaoui B, D'Andrea M, Pilla F, Capote J, Zidi A, Jordana J, Ferrando A, Delgado JV, Martínez A, Vidal O, Amills M. (2011) Polymorphism of the Goat Agouti Signaling Protein Gene and Its Relationship with Coat Color in Italian and Spanish Breeds. *Biochem Genet.*
- Bahadoran P., Busca R., Chiaverini C., Westbroek W., Lambert J., Bille K., Valony G., Fukuda M., Naeyaert J.-M., Ortonne J.-P., Ballotti R. (2003). Characterization of the Molecular Defects in Rab27a, Caused by RAB27. A Missense Mutations Found in Patients with Griscelli Syndrome. *J. Biol. Chem.* 278(13): 11386 - 11392.
- Barone C.M.A, Cappuccio A, Colatruglio P, Fortunato M, Zullo A, Matassino D. (1999) Studio di alcune caratteristiche somatiche del tipo genetico ovino “Bagnolese”. *L'allevatore di Ovini e Caprini*, 16, (3), 6.

- Battacone G., Il colore del mantello
- Baumung R, Cubric-Curik V, Schwend K, Achmann R, Sölkner J. (2006) Genetic characterisation and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J Anim Breed Genet.* Aug;123(4):265-71
- Beja-Pereira A, Alexandrino P, Bessa I, Carretero Y, Dunner S, Ferrand N, Jordana J, Laloe D, Moazami-Goudarzi K, Sanchez A, Canon J. (2003). Genetic characterization of south-western European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *J Hered*;94:243–250.
- Belinda J. Norris and Vicki A. Whan (2008) A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res.* 18(8):1282-93. Epub 2008 May 20.
- Bellitti E, Bufano G, Celi R. (1970) Studio biometrico della popolazione ovina Altamurana. *Annali della Facoltà di Agraria Bari*, XXIV, 245-270
- Bellitti E, Zezza L, Muscio A, Casamassima D. (1974) Conformazione e tipo morfologico degli ovini di razza Altamurana. *Scienza e Tecnica Agraria*, XIV, n.4, 24.
- Bennett DC, Lamoreux ML (2003) The color loci of mice. A genetic century. *Pigment Cell Res* 16: 333–344.
- Berryere T.G.; Schmutz S.M.; Schimpf R.J.; Cowan C.M.; Potter. (2003). TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *J. Animal Genetics.* 34: 169-175(7).
- Bjornstad G. and Roed K. H. (2002) Breed demarcation and potential for breed allocation of horses assessed by microsatellite markers. *Anim Genet* 32: 59 – 65.
- Blott SC, Williams JL, Haley CS. (1999). Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity.* 82:613-9.

- Blott S. C., Williams J. L., Haley C. S. (1998). Genetic relationships among European cattle breeds. *Anim. Genet.* 29:273-282.
- Bonelli P. (1961). Considerazioni critiche e metodologia applicativa sulla produttività della pecora Sarda. *Allevamenti e Veterinaria*, n.12.
- Bowcock A. M., Ruiz-Linares A., Tomfohrde J. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368, 455-457.
- Bowcock, A.M., Kidd J.R., Mountain J.L., Hebert J.M., Carotenuto L., Kidd K.K., Cavalli-Sforza L.L.. (1991). Drift, admixture, and selection in human evolution: A study with DNA polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 839-843.
- Bozzi R, Degl’Innocenti P, Rivera Diaz P, Nardi L, Crovetto A, Sargentini C & Giorgetti A (2009) Genetic characterization and breed assignment in five Italian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Ruminant Research* 85, 50–57.
- Buchanan, F. C., Adams L. J., Littlejohn R. P., Maddox J. F., Crawford A. M. (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22:397-403.
- Caballero A., Toro M. A. (2002) Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. *Conservation Genetics*, 3: 289-299
- Canon J, Checa M.L., Carleos C., Vega-Pla J.L., Vallejo M., Dunner S. (2000). The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim Genet.* 31(1):39-48.
- Capoferri R., Galli A., Bongioni G. (2005) La tracciabilità genetica nella filiera bovina mediante analisi degli SNPs. 4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy, April 29 th - May 1st.
- Casu S. (1967). Allevamento ovino da latte in Sardegna : Situazione attuale e possibilità di evoluzione. *CIHEAM - Options Mediterraneennes*



- Cavalli-Sforza L L and Edwards A. W. F. (1967). Phylogenetic Analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 32 550–570.
  
- Celi R, Bellitti E, Martiradonna M, De Santis A (1978) Le modificazioni adattive nelle popolazioni ovine. 2. Il comportamento fisiologico degli ovini Leccesi in diversi ambienti climatici. *Annali della Facoltà di Agraria , Bari*, XXX, 201-212.
  
- Chakraborty R, Jin L. (1993). A unified approach to study hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. *EXS.*;67:153-75.
  
- Chen K., Manga P., Orlow S.J. (2002). Pink-eyed dilution protein controls the processing of tyrosinase. *Mol Biol Cell*. 13(6):1953-64.
  
- Ciampolini R., Leveziel H., Mazzanti E., Grohs C., Ciani D. (2000). Genomic identification of the breed of an individual or its tissue. *Meat Sci*. 54:35-40.
  
- Ciampolini R., Cecchi F., Mazzanti E., Ciani E., Tancredi M., De Sanctis B. (2007). The genetic variability of the Amiata donkey breed by molecular data. *Ital. J. Anim. Sci.* Vol. 6 (Suppl. 1), 78-80.
  
- Ciani D, Bufano G, Zezza L. (1968) Studio biometrico della popolazione Moscia Leccese. *Annali della Facoltà di Agraria Bari*, XXII, p. III, 287-314
  
- Costin G.E., Valencia J.C., Vieira W.D., Lamoreux M.L. Hearing V.J. (2003). Tyrosinase processing and intracellular trafficking is disrupted in mouse primary melanocytes carrying the underwhite (uw) mutation. A model for oculocutaneous albinism (OCA) type 4. *J Cell Sci*. 116:3203-12.
  
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., Solignac M. (1999). New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153(4):1989-2000.

- Crepaldi, P., Marilli, M., Gorni, C., Meggiolaro, D., Cicogna, M., Renieri, C., (2003). Preliminary study on MC1R polymorphism in some cattle breeds raised in Italy. *Ital. J. Anim. Sci.* 2 (Suppl. 1):13-15.
  
- D'Angelo F, Albenzio M, Sevi A, Ciampolini R, Cecchi F, Ciani E, Muscio A. (2009) Genetic variability of the Gentile di Puglia sheep breed based on microsatellite polymorphism. *J Anim Sci.* Apr;87(4):1205-9. Epub 2008 Dec 19.
  
- D'Alessandro E, Fontanesi L, Liotta L, Davoli R, Chiofalo V & Russo V (2007). Analysis of the MC1R gene in the Nero Siciliano pig breed and usefulness of this locus for breed traceability. *Veterinary Research Communication* 31 (Suppl. 1) 389–392.
  
- Dalvit, C., Saccá, E., Cassandro, M. et al. (2008) Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. *Small Rumin Res.*, 80:45-51.
  
- Dalvit C, De Marchi M, Zanetti E, Cassandro M. (2009) Genetic variation and population structure of Italian native sheep breeds undergoing in situ conservation. *J Anim Sci.* 87(12):3837-44
  
- Davies N., Villablanca F. X., Roderick, G. K. (1999). Determining the source of newly founded populations: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 14, 17-21.
  
- Deng WD, Yang SL, Huo YQ, Gou X, Shi XW, Mao HM. (2006) Physiological and genetic characteristics of black-boned sheep (*Ovis aries*). *Anim Genet.* 37(6):586-8.
  
- Deng W. D., Xi D. M, Gou X., Yang S. L., Shi X. W and Mao H. M. Pigmentation in Black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the Tyrosinase gene. *Mol Biol Rep* (2008) 35:379–385
  
- Deng WD, Shu W, Yang SL, Shi XW, Mao HM. (2007). Pigmentation in Black-boned sheep (*Ovis aries*): association with polymorphism of the Mc1r gene. *Mol. Biol. Rep.* 2009 Mar;36(3):431-6.

- Diez-Tascón C, Littlejohn RP, Almeida PA, Crawford AM (2000) Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites *Anim Genet.*(4):243-51.
- Eding, H. and Mewissem, T.H.E. (2001) Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity *J. Anim. Breed. Genet.*, 118:141-159.
- Eldridge M.D., Kinnear J.E., Onus M.L. (2001). Source population of dispersing rock-wallabies (*Petrogale lateralis*) identified by assignment tests on multilocus genotypic data. *Mol Ecol.* 10(12):2867-76.
- Fontanesi L, Tazzoli M, Beretti F & Russo V (2006) Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associated with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Animal Genetics* 37, 489–493.
- Fontanesi L. (2009a). Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. *Italian Journal of Animal Science* 8 (Suppl. 2) 9–18.
- Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall’Olio S, Gómez González E, Finocchiaro R, Davoli R, Russo V & Portolano B (2009b) Missense and nonsense mutations in melanocortin 1 receptor (MC1R) gene of different goat breeds: association with red and black coat colour phenotypes but with unexpected evidences. *BMC Genetics* 10 47.
- Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Gómez González E, Dall’Olio S, Davoli R, Russo V & Portolano B (2009c) Copy number variation and missense mutations of the agouti signaling protein (ASIP) gene in goat breeds with different coat colours. *Cytogenetic and Genome Research* 126 333–347
- Fontanesi L, Beretti F, Riggio V, Dall’Olio S, Calascibetta D, Russo V & Portolano B (2010a) Sequence characterization of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene in

sheep with different coat colour and identification of the putative e allele at the ovine Extension locus. *Small Ruminant Research* 91 200–207.

- Fontanesi L, Forestier L, Allain D, Scotti E, Beretti F, Deretz-Picoulet S, Pecchioli E, Vernesi C, Robinson TJ, Malaney JL, Russo V & Oulmouden A (2010b) Characterization of the rabbit agouti signaling protein (ASIP) gene: Transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causative mutation of the nonagouti black coat colour. *Genomics* 95 166–175
- Fontanesi L., Beretti F., Dall'Olio S., Portolano B, Matassino D. and Russo V. (2011a) A melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphism is useful for authentication of Massese sheep dairy products *Journal of Dairy Research* 78 122–128.
- Fontanesi L, Dall'Olio S, Beretti F, Portolano B & Russo V (2011b) Coat colours in the Massese sheep breed are associated with mutations in the agouti signaling protein (ASIP) and melanocortin 1 receptor (MC1R) genes. *Animal*, doi:10.1017/S1751731110001382
- Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW. (2006). Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol.* 4(1):e6.
- Girardot M, Martin J, Guibert S, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A. (2005). Widespread expression of the bovine Agouti gene results from at least three alternative promoters. *Pigment Cell Res.* 18(1):34-41.
- Gizaw S, Van Arendonk JA, Komen H, Windig JJ, Hanotte O. (2007) Population structure, genetic variation and morphological diversity in indigenous sheep of Ethiopia. *Anim Genet.* 2007 Dec;38(6):621-8. Epub 2007 Nov 20.
- Glover KA, Hansen MM, Lien S, Als TD, Høyheim B, Skaala O (2010) A comparison of SNP and STR loci for delineating population structure and performing individual genetic assignment. *BMC Genet.* 11:2.

- Glowatzki-Mullis M.L., Muntwyler J., Bäumle E. & Gaillard C.(2008) Genetic diversity measures of Swiss goat breeds as decision-making support for conservation policy. *Small Ruminant Research* 74, 202–11.
- Glowatzki-Mullis ML, Muntwyler J, Bäumle E, Gaillard C. (2009) Genetic diversity of Swiss sheep breeds in the focus of conservation research. *J Anim Breed Genet.* 2009 Apr;126(2):164-75
- Goffaux F, China B, Dams L, Clinquart A, Daube G. (2005) Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic Sci Int.* Jul 16;151(2-3):239-47. Epub 2005 Apr 19.
- Graphodatskaya, D., Joerg, H., & Stranzinger, G. (2002). Molecular and pharmacological characterization of the MSH-R alleles in Swiss cattle breeds. *Journal of receptor and signal transduction research*, 22, 421-430.
- Gratten J, Beraldi D, Lowder BV, McRae AF, Visscher PM, Pemberton JM, Slate J. (2007) Compelling evidence that a single nucleotide substitution in TYRP1 is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proc Biol Sci.* 274(1610):619-26.
- Guibert S, Girardot M, Leveziel H, Julien R, Oulmouden A. (2004). Pheomelanin coat colour dilution in French cattle breeds is not correlated with the TYR, TYRP1 and DCT transcription levels. *Pigment Cell Res.* 17(4):337-45.
- Gutiérrez JP, Royo LJ, Alvarez I, Goyache F. (2005) MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *J Hered.* 2005 Nov-Dec;96(6):718-21. Epub 2005 Oct 26.
- Gutiérrez-Gil B, Wiener P, Williams JL. (2007) Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-Backcross Charolais x Holstein population. *BMC Genet.* 8:56.

- Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, Stone RT, Grosse WM, Casas E, Keele JW, Smith TP, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. (2002) Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm Genome*.13(5):272-81.
- Heaton MP, Keen JE, Clawson ML, Harhay GP, Bauer N, Shultz C, Green BT, Durso L, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. (2005) Use of bovine single nucleotide polymorphism markers to verify sample tracking in beef processing. *J Am Vet Med Assoc*. 226(8):1311-4.
- Henderson, S.T. and T.D. Petes. (1992) Instability of simple sequence DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol*. 12:2749-2757
- Hirobe T, Kawa Y, Mizoguchi M, Ito S, Wakamatsu K. (2002). Effects of genic substitution at the pink-eyed dilution locus on the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes in vivo and in vitro. *J Exp Zool*. 292(4):351-66.
- ISAG/FAO Standing Committee. 2004. Secondary Guidelines for Development of National Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (Mo-DAD): Recommended Microsatellite Markers. Recommendations of joint ISAG/FAO Standing Committee. <http://dad.fao.org/> Accessed Jan. 26, 2009.ISAG/FAO per la “Measurement of Domestic Animal Diversity” (2004).
- Jackson I. J., Chambers D. M., Tsukamoto K., Copeland N. G., Gilbert D. J., Jenkins N. A., Hearing V. (1992). A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J*. 11, 527-535.
- Jackson I. J. (1988). A cDNA encoding tyrosinase-related protein maps to the brown locus in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 4392-4396.
- Jackson I. J. and D. C. Bennett. (1990). Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7010-7014.

- Jandurova O M, Kott T, Kottava B, Czernekova V and Milerski M 2005 Genetic relationships among Sumava, Valachian and Improved Valachian sheep. *Small Ruminant Research* 57:157-165
  
- Jeanpierre M. (1987). A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 25;15(22):9611.
  
- Joerg H., Fries H. R, Meijernik E., Stranzinger G. F. (1996). Red coat colour is associated with a deletion in the MSHR gene. *Mamm. Genome* 7:317–318.
  
- Jolly RD, Wills JL, Kenny JE, Cahill JI, Howe L. (2008) Coat-colour dilution and hypotrichosis in Hereford crossbred calves. *N Z Vet J.* 56(2):74-7.
  
- Jordana J., Alexandrino P., Beija-Pereira A., Bessa I., Cañon J., Carretero Y., Dunner S., Laloë D., Mozami-Goudarzi K., Sanchez A. and Ferrand N. (2003). Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *J. Anim. Genet.* 120: 73-87.
  
- Kantanen J, Olsaker I, Brusgaard K, Eythorsdottir E, Holm LE, Lien S, Danell B, Adalsteinsson S. (2000). Frequencies of genes for coat colour and horns in Nordic cattle breeds. *Genet Sel Evol.* 32(6):561-76.
  
- Kijas JMH, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M & Andersson L (1998) Melanocortin Receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150 1177–1785
  
- Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, Heaton MP, Maddox JF, McGrath A, Wilson P, Ingersoll RG, McCulloch R, McWilliam S, Tang D, McEwan J, Cockett N, Oddy VH, Nicholas FW, Raadsma H; International Sheep Genomics Consortium (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS One*.(3):e4668. Epub 2009 Mar 3.

- Klungland H., Vage D. I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S. (1995). The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat colour determination. *Mamm. Genome* 6:636–639.
- Koskinen M.T. (2003). Individual assignment using microsatellite DNA reveals unambiguous breed identification in the domestic dog. *Anim Genet.* 34(4):297-301.
- Kriegesmann B., Jansen S., Pfeiffer I., Brenig B. (1999). The bovine melanocortin-1 receptor (MC1R) as a model for G-proteincoupled receptors (GPCRs). *Arch. Tierz.* 42(Special Issue):55–60.
- Kriegesmann B., Dierkes B., Leeb T., Jansen S., Brenig B. (2001) Two breed-specific bovine MC1-R alleles in Brown Swiss and Saler breeds. *J Dairy Sci.* 84(7):1768-71.
- Kruskall W.H. and Wallis W.A. (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47 (260): 583–621.
- Kuehn C and Weikard R (2007) Multiple splice variants within the bovine silver homologue (SILV) gene affecting coat color in cattle indicate a function additional to fibril formation in melanophores. *BMC Genomics.* 8:335
- Kwon B. S., Asifa K. Haq, Seymour H. Pomerantz, Ruth Halaban. (1987). Isolation and Sequence of a cDNA Clone for Human Tyrosinase that Maps at the Mouse C-Albino Locus. *PNAS* 84: 7473-7477.
- Ligda et al., 2009; Ligda, C. H., J. Altarayrah, A. Georgoudis and ECONOGENE Consortium (2009) Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Rumin. Res.* 83:42-48.
- MacHugh D.E., Loftus R.T., Cunningham P., Bradley D.G. (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*, 29: 333-340.



- Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W, Riek R. (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science*. 325(5938):328-32. Epub 2009 Jun 18.
- Manel S., Bellemain E., Swenson J.E., Francois O. (2004). Assumed and inferred spatial structure of populations: the Scandinavian brown bears revisited. *Mol Ecol*. 13(5):1327-31.
- Marilli M., Meggiolaro D., Bonato L., Filippini F., Negrini R., Ajmone-Marsan P., Crepaldi P. (2003). Melanocortin receptor 1 (MC1R) G310 mutation and coat colour in an Italian cattle breed; *Pigment cell research*. 16; pagg. 598.
- Marklund L, Johansson Moller M, Sandberg K & Andersson L (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome* 7, 895–899.
- Mario Adda Editore: “La Valorizzazione delle razze ovine autoctone dell’Italia Meridionale Continentale”
- Maudet C, Luikart G & Taberlet P (2002a) Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *Journal of Animal Science* 80, 942–950.
- Maudet C, Taberlet P (2002b). Holstein's milk detection in cheeses inferred from melanocortin receptor 1 (MC1R) gene polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 85:707-715.
- Mburu D.N., Ochieng J.W., Kuria S.G., Jianlin H., Kaufmann B., Rege J.E., Hanotte O. (2003). Genetic diversity and relationships of indigenous Kenyan camel (*Camelus dromedarius*) populations: implications for their classification. *Anim Genet*. 34(1):26-32.

- Menasche G., Feldmann J., Houdusse A., Desaymard C., Fischer A., Goud B., Basile S. (2003). Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli syndrome patients. *Blood*. 101(7): 2736 - 2742.
  
- Meszaros, S.A., Banks, R.G. and Van der Werf, J.H.J (1998) Optimizing breeding structure in sheep flocks when inbreeding depresses genetic gain through effects on reproduction *Proc. 6th WCGALP*, Armidale, Australia, January 11-16, vol.25, 415.
  
- Moazami-Goudarzi K., Laloë D., Furet J. P., Grosclaude F. (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Anim. Genet.* 28:338-345.
  
- Moioli, B., F. Napolitano, L. Orrù, and G. Catillo (2006) Analysis of the genetic diversity between Gentile di Puglia, Sopravissana and Sarda sheep breed using microsatellite markers. *Ital. J. Anim. Sci.* 5:73–78.
  
- Montemurro O, Cianci D. (1963) Ricerche biometriche su ovini di razza Altamurana. *Annali della Facoltà di Agraria Bari*, XVII, 133-163
  
- Montemurro O, Cianci D. (1976) La qualità della lana negli ovini di razza Leccese. *Annali della facoltà di Agraria, Bari*, XVI, 315-318.
  
- Mountain J., Cavalli-Sforza L. L. (1997). Multilocus genotypes, a tree of individuals, and human evolutionary history. *Am. J. Hum. Genet.* 61:705-718
  
- Muller G., Ruppert S., Schmid E., Schutz G. (1988). Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. *EMBO J.* 7: 2723-2730.
  
- Nakamura M.; Tobin D.J.; Richards-Smith B.; Sundberg J.P.; Paus R. Mutant laboratory mice with abnormalities in pigmentation: annotated tables. *J. Dermatol. Sci.* 28(1):1-33.

- Negrini R, Milanesi E, Colli L, Pellecchia M, Nicoloso L, Crepaldi P, Lenstra JA, Ajmone-Marsan P. (2007) Breed assignment of Italian cattle using biallelic AFLP markers. *Anim Genet.* 38(2):147-53. Epub 2007 Feb 27.
- Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, Milanesi E, Colli L, Chegiani F, Pariset L, Dunner S, Leveziel H, Williams JL & Ajmone Marsan P (2009) Assessing SNP markers for assigning individuals to cattle populations. *Animal Genetics* 40, 18–26.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations; *Am. Nat.* 106 283–292
- Oliehoek PA, Windig JJ, van Arendonk JA, Bijma P. (2006) Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. *Genetics*.173(1):483-96. Epub 2006 Mar 1
- Orlow S.J., Brilliant M.H. (1999). The pink-eyed dilution locus controls the biogenesis of melanosomes and levels of melanosomal proteins in the eye. *Exp. Eye Res.* 68, 147-154.
- Papa P., Biagetti M., Sebastiani C., Laudisio P., Ghiandoni S., Pezzotti G., Fogliani A. (2004). Tracciabilità genetica nella filiera bovina: Short Tandem Repeats (STR) per la verifica del sistema di etichettatura. *SPV* (24)
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C.. (1995) Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-354.
- Paetkau D, Waits LP, Clarkson PL, Craighead L, Strobeck C. (1997) An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations. *Genetics*.147(4):1943-57.
- Pariset L, Savarese M C, Cappuccio I and Valentini A (2003) Use of microsatellites for genetic variation and inbreeding analysis in Sarda sheep flocks of central Italy. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120: 425-432

- Pariset L, Cappuccio I, Ajmone-Marsan P, Bruford M, Dunner S, Cortes O, Erhardt G, Prinzenberg EM, Gutscher K, Joost S, Pinto-Juma G, Nijman IJ, Lenstra JA, Perez T, Valentini A; Econogene Consortium (2006) Characterization of 37 breed-specific single-nucleotide polymorphisms in sheep. *J Hered.* 97(5):531-4. Epub 2006 Sep 14.
- Passino F. (1935). Le vicende dell'allevamento della pecora Sarda. *Nuovi Annali*
- Pastural E., Barrat F.J., Dufourcq-Lagelouse R., Certain S., Sanal O., Jabado N., Seger R., Griscelli C., Fischer A., de Saint Basile G. (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat. Genet* 16:289-292.
- Pelosi A. (1991) La razza ovina Laticauda Prospettive per il miglioramento e la selezione – Origini storico zootecniche e programma di sviluppo. Atti Convegno Valorizzazione e miglioramento della razza ovina “Laticauda”, Benevento 18 Dicembre, 17-23.
- Peter C, Bruford M, Perez T, Dalamitra S, Hewitt G, Erhardt G; ECONOGENE Consortium (2007) Genetic diversity and subdivision of 57 European and Middle-Eastern sheep breeds. *Anim Genet.* Feb;38(1):37-44.
- Primmer C.R., Koskinen M.T., Piironen J. (2000). The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B.* 267: 1699-1704.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Rannala B., Mountain J. L. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:9197-9201.
- Reale S, Campanella A, Merigioli A, Pilla F. (2008) A novel method for species identification in milk and milk-based products. *J Dairy Res.* 75(1):107-12. Epub 2008 Jan 29.

- Rendo F, Iriondo M, Jugo BM, Mazo'n LI, Aguirre A, Vicario A, Estonba A. (2004) Tracking diversity and differentiation in six sheep breeds from the North Iberian Peninsula through DNA variation. *Small Ruminant Res* 52:195–202.
- Reynolds J. B., Weir B. S., Cockerham C. C. (1983). Estimation of the co-ancestry co-efficient; basis for a short term genetic distance; *Genetics* 105 767–779.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*.72(6):827-34.
- Rolando A., Di Stasio L. (2006) MC1R gene analysis applied to breed traceability of beef. *Ital.J.Anim.Sci.* 5, 87-91.
- Roques S, Duchesne P, Bernatchez L. (1999). Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Mol Ecol.* 8(10):1703-17.
- Rosenberg N.A., Burke T., Elo K., Feldman M.W., Freidlin P.J., Groenen M.A., Hillel J., Maki-Tanila A., Tixier-Boichard M., Vignal A., Wimmers K., Weigend S. (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*. 159(2):699-713.
- Rouzaud F., Martin J., Gallet P.F., Delourme D., Goulemot-Leger V., Amigues Y., Menissier F., Leveziel H., Julien R., Oulmouden A. (2000). A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol.* 32(5):511-20.
- Rubino R, Nardone A, Carena A, Matassino D (1983) I sistemi produttivi ovino e caprini nel Mezzogiorno d'italia. *Prod. Anim.* 2 ns, 125.

- Russell L.B., Montgomery C.S., Cacheiro N.L., Johnson D.K. (1995). Complementation analyses for 45 mutations encompassing the pink-eyed dilution (p) locus of the mouse. *Genetics* 141, 1547-1562.
- Russo V & Fontanesi L (2004) Coat colour gene analysis and breed traceability. *Proceedings of the 7th World Brown Swiss Conference*, pp. 95–100, Verona, Italy.
- Russo V, Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Dall'Olio S & Davoli R (2007). Analysis of melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. *Italian Journal of Animal Science* 6 257–272.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (1977) *Biotechnology*. 1992;24:104-8.
- Santos-Silva, F., R. S. Ivo, M. C. O. Sousa, M. I. Carolino, C. Ginja and L. T. Gama (2008) Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Rumin. Res.* 78:32-40.
- Schmid M., Saitbekova N., Gaillard C., Dolf G. (1999). Genetic diversity in Swiss cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* 116: 1-8.
- Schmutz S.M., Berryere T. G., Ciobanu D. C., Mileham A. J., Schmidt B. H., Fredholm M. (2004). A form of albinism in cattle is caused by a tyrosinase frameshift mutation. *Mammalian Genome*. 15:62-67.
- Silvers W. K. (1979). *The Coat Colors of the Mouse*, Springer-Verlag, New York.
- Slatkin M., Excoffier L. (1996). Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*. 76:377-83.
- Sodhi M, Mukesh M and Bhatia S (2006) Characterizing Nali and Chokla sheep differentiation with microsatellite markers. *Small Ruminant Research* 65: 185-192

- Stahlberger-Saitbekova N, Schläpfer J, Dolf G, Gaillard C (2001) Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Volume 118, Issue 6, pages 379–387
  
- Syvänen AC. (2001) Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet*. Dec;2(12):930-42. Review.
  
- Swofford D.L., Selander R.B. (1981). BIOSYS-1: A fortran program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72:281-283.
  
- Takeuchi, S., H. Suzuki, M. Yabuuchi and S. Takahashi, (1997) A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta* 1308: 164–168.
  
- Tapio M, Tapio I, Grislis Z, Holm L-E, Jeppsson S, Kantanen J, Miceikiene L, Olsaker H, Viinalass H and Eythorsdottir E (2005) Native breeds demonstrate high contributions to the molecular variation in northern European sheep. *Molecular Ecology* 14:3951-63.
  
- Toro M, Barragan C, Ovilo C, Rodriguez J, Rodriguez C, and Silio L, (2002) Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Conserv Genet* 3:309–320.
  
- Toro MA, Barragan C, and Ovilo C, (2003) Estimation of genetic variability of the founder population in a conservation scheme using microsatellites. *Anim Genet* 34:226–228.
  
- Våge Dag Inge, Helge Klungland, Dongsu Lu and Roger D. Cone. (1999). Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep *Mammalian Genome* 10, 39–43.

- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ (1995) Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 11(3):328-30.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Sel Evol.* 2002 May-Jun;34(3):275-305. Review.
- Weber, J. and C. Wong. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2:1123-1128.
- Weir BS (1996) *Genetic Data Analysis II.*, Sinauer: Sunderland, MA.
- Werner FA, Durstewitz G, Habermann FA, Thaller G, Krämer W, Kollers S, Buitkamp J, Georges M, Brem G, Mosner J, Fries R. (2004) Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Anim Genet.* 35(1):44-9.
- Wright S. (1951). The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 313-354.
- Wright S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Wright S. (1978) *Evolution and the genetics of populations*, vol. 4, *Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press.
- Wu X., Wang F., Rao K., Sellers J. R., Hammer J. A. (2002). Rab27a is an essential component of Melanosome Receptor for Myosin Va. *Mol. Biol. Cell.* 13(5): 1735-1749.
- Yang SL, Mao HM, Shu W, Deng WD (2006) Melanin traits of Yunnan black bone sheep and TYR gene polymorphism. *Yi Chuan.* 28(3):291-8. Chinese.
- U.R.L. [www.albinismdb.med.umn.edu](http://www.albinismdb.med.umn.edu)



- U.R.L. [www.anabic.it](http://www.anabic.it)
- U.R.L. [www.anaborapi.it](http://www.anaborapi.it)
- U.R.L. [www.anagrafe.izs.it](http://www.anagrafe.izs.it)
- U.R.L. [www.europarl.eu](http://www.europarl.eu)
- U.R.L. [www.fao.org](http://www.fao.org)
- U.R.L. [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- U.R.L. [www.skyway.usask.ca/~schmutz/colors.html](http://www.skyway.usask.ca/~schmutz/colors.html)
- U.R.L. [www.comisana.it](http://www.comisana.it)
- U.R.L. [www.agriturist.it](http://www.agriturist.it)
- U.R.L. [www.sheephapmap.org](http://www.sheephapmap.org)
- U.R.L. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>



UNIVERSITÀ DI PISA

***DOTTORATO DI RICERCA IN PRODUZIONI ANIMALI, SANITA'  
E IGIENE DEGLI ALIMENTI NEI PAESI A CLIMA MEDITERRANEO***

*Presidente: Prof.ssa Daniela Gianfaldoni*

*Tel. 050-2216987 – Fax 050 – 2216941*

*Email: dani@vet.unipi.it*

*Pisa, 22/10/2010*

*Prot. 631/2.0.4*

**Oggetto: Attestato di attribuzione Borsa “Fondo Giovani” alla Dottoressa Assunta Bramante per il triennio 2008-2010 - Programma di Dottorato di Ricerca in “*Produzioni Animali, Sanità e Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima Mediterraneo*”.**

Si attesta che la Dottoressa Assunta Bramante nel triennio 2008-2010 ha usufruito, nell’ambito del Programma del Dottorato di Ricerca in “*Produzioni Animali, Sanità e Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima Mediterraneo*”, di una borsa di studio bandita dal Ministero dell’Istruzione, dell’Università e della Ricerca, per il sostegno dei giovani (Borse Ministeriali “Fondo Giovani”). Le attività di ricerca, oggetto della tesi di dottorato della Dottoressa Assunta Bramante, sono state finanziate nel contesto del Progetto Speciale, dal titolo “**La tracciabilità di razza della carne ovina con metodologie di genetica molecolare**”, acronimo “**TR.OVI.GEN**”, finanziato dal Ministero Italiano delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali.

Il Direttore del Programma di Dottorato in  
“Produzioni Animali, Sanità e Igiene degli Alimenti  
dei Paesi a Clima Mediterraneo”

Prof. Daniela Gianfaldoni

**CONVENTION DE COOPERATION POUR COTUTELLE DE  
THESE ENTRE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES ET UN  
ETABLISSEMENT D'ENSEIGNEMENT  
SUPERIEUR ETRANGER**

Conformément à l'arrêté ministériel du 6 janvier 2005 du Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche relatif à la cotutelle internationale de thèse entre établissements d'enseignement supérieur français et étranger, et vu le règlement pour le doctorat de recherche exhalé avec du D.R. n. 01/1130 du 30 Août 1999 et modifications suivantes, la présente convention est conclue entre :

Université de Pise  
Italie  
Lungarno Pacinotti, 43 - 56126 Pisa  
représentée par Pasquali Marco, Recteur

**ET**

L'Université de Limoges  
France  
33, rue François Mitterrand - BP 23204 - 87032 Limoges cedex  
représentée par Monsieur Jacques FONTANILLE, Président.

**La présente convention concerne :**

Mlle, Bramante Assunta

N° d'étudiant (e) .... Université de Pise, numero 433412

Né(e) le ...03/01/1982..... à ..... Napoli.....  
de nationalité Italienne.....

Cocher la case :  
☐ titulaire du Master

X dispensé(e) du Master et autorisé(e) à s'inscrire par dérogation accordée par le Président de l'Université de Limoges, sur proposition du responsable de l'Ecole Doctorale (joindre l'arrêté du Président).

**Article I**

**Inscription** (la doctorante ou le doctorant doit s'inscrire obligatoirement dans les deux établissements)

La doctorante ou le doctorant est inscrit(e)

1 - à l'Université de Limoges  
en Doctorat de ...Biologie, Sciences, Santé.....  
relevant de l'Ecole Doctorale : STS 258.....  
et de la composante : Faculté de Sciences.....  
à compter de l'année universitaire ...2007/2008.....



ET

2 - à l'Université de ...Pise...(Italie).....  
en (libellé du diplôme préparé) Doctorat de recherches  
à compter de la rentrée universitaire ..... 2007/2008.....

Le sujet de thèse déposé par la doctorante ou le doctorant est (intitulé complet) : **Identification des marqueurs génétiques pour une traçabilité raciales des populations ovines et de leurs produits dérivés**

### Directrices ou Directeurs de thèse

La doctorante ou le doctorant effectue sa scolarité et ses travaux de recherche sous la responsabilité conjointe d'une directrice ou d'un directeur de thèse dans les deux établissements qui s'engagent à exercer pleinement leurs fonctions d'encadrement.

A l'Université de Limoges, la directrice ou le directeur de thèse est :  
Mme, M. (prénom, nom, titre et fonction) Professeur Oulmouden Ahmad

A l'établissement partenaire, la directrice ou le directeur de thèse est :  
Mme, M. (prénom, nom, titre et fonction) ...Ciampolini Roberta Docteur Chargé de Recherches, département de productions animales .....

### FRAIS D'INSCRIPTION ET DROITS DE SCOLARITÉ

La doctorante ou le doctorant ne paiera les frais d'inscription et les droits de scolarité que dans un seul des deux établissements partenaires, à savoir, de préférence, l'établissement de son pays d'origine.

### Article 2 : Sclarité et Thèse

La durée prévisionnelle de la scolarité et des travaux de recherche de la doctorante ou du doctorant est de trois ans. Elle pourra être prolongée par accord spécifique entre les deux établissements, sur proposition conjointe des deux directrices ou directeurs de thèse. La doctorante ou le doctorant effectue sa scolarité et ses travaux de recherche en alternance entre les deux établissements, par périodes déterminées d'un commun accord entre les deux directrices ou directeurs de thèse, selon les modalités suivantes :

**Périodes prévisionnelles à l'Université de Limoges (indiquer les années et cocher les cases correspondant aux mois où la doctorante ou le doctorant sera à l'Université de Limoges).**

Année	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill.	Août	Sept.
2007/2008									X	X		X
2008/2009	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
2010/2011	X	X	X	X	X	X						

**Périodes prévisionnelles dans l'établissement d'enseignement supérieur de : Université de Pise (Italie).**

Année	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill.	Août	Sept.
2007/2008			X	X	X	X	X	X				
2009/2010												
2010/2011							X	X	X			

**ATTENTION :** tout changement doit être autorisé par les directrices ou directeurs de thèse.

La protection du sujet de thèse ainsi que la publication, l'exploitation et la protection des résultats de recherche issus des travaux de recherche de la doctorante ou du doctorant sont assujetties à la législation en vigueur et assurées conformément aux procédures spécifiques à chaque pays engagé dans la présente cotutelle.



### Article 3 : Couverture sociale et responsabilité civile

La doctorante ou le doctorant bénéficie de la couverture sociale et de la responsabilité civile selon les modalités suivantes (*cocher la case correspondante*) :

- responsabilité civile : souscrite par la doctorante ou par le doctorant (joindre l'attestation d'assurance).

☒ adhésion à la Sécurité Sociale régime étudiant      ☒ français ou    ☐ étranger

☐ adhésion au Régime général de Sécurité Sociale (cas des salariés)

☐ un autre régime (*préciser et joindre le justificatif*) : .....

### **MODALITÉS PÉDAGOGIQUES**

#### Article 4 : Déroulement de la scolarité

Les activités pédagogiques de la doctorante ou du doctorant sont les suivantes (*préciser les cours, séminaires, etc. ...*) :

- à l'Université de Limoges :

Formations obligatoires

1er année de thèse : - Sensibilisation à l'économie d'entreprise

2ème année : une formation au choix .

- Management de groupe
- Propriétés intellectuelles et industrielles
- Conduite de projet.....

La prise en charge des frais correspondants incombe à : .....

pour un montant de (*facultatif*) : .....

- à l'établissement d'enseignement supérieur partenaire de ...Université de Pise.....

La prise en charge des frais correspondants incombe à : .....

pour un montant de (*facultatif*) : .....

La charte des thèses de l'Université de Limoges, signée par les deux directeurs de thèse, sera remise à la doctorante ou au doctorant.

#### Article 5 : Soutenance

La thèse donne lieu à une soutenance unique, reconnue par les deux établissements.

Le jury de soutenance, désigné par les deux établissements partenaires, est composé sur la base d'une proportion équilibrée de membres de chaque établissement conformément à l'arrêté du 6 janvier 2005. En cas de désaccord sur la composition du jury, la décision appartient au Président de l'établissement du pays de soutenance de la thèse.

La doctorante ou le doctorant soutiendra sa thèse (soutenance unique) :

☐ à l'Université de Limoges

☐ à l'établissement d'enseignement supérieur de : .....Pise.....

A titre prévisionnel, la soutenance aura lieu (*mois et année*) : .....Pisa, Juin 2011 .....



La thèse sera rédigée et soutenue en langue .

(cocher la case correspondante, sachant que lorsque cette langue n'est pas le français, la rédaction est complétée par un résumé substantiel en langue française).

☐ Française ☒ autre (*préciser*) : Italien

Le résumé de la thèse sera rédigé et présenté en langue :

X Française ☒ autre (*préciser*) : Italien

#### **Article 6 : Délivrance du diplôme**

Après soutenance de la thèse, les établissements contractants peuvent délivrer à l'étudiant :

- soit un diplôme de docteur qu'ils confèrent conjointement ;
- X soit simultanément un diplôme de docteur de chacun d'entre eux.

Dans l'un comme dans l'autre cas :

- le ou les diplômes de docteur sont délivrés par les autorités académiques habilitées à le faire, sur proposition conforme du jury, après la soutenance de la thèse ;
- sur le ou les diplômes de docteur figurent une indication de spécialité ou de discipline, le titre de la thèse ou l'intitulé des principaux travaux, la mention de la cotutelle internationale, les noms et titres des membres du jury et la date de soutenance.

Dans chaque pays, la protection du sujet, le dépôt, le signalement et la reproduction de la thèse seront effectués selon la réglementation en vigueur.

#### **AUTRES DISPOSITIONS**

Préciser en annexe toute autre disposition concernant notamment les conditions matérielles spécifiques de l'accueil.

#### **MODIFICATION ET RÉSILIATION**

Il est de la responsabilité de la doctorante ou du doctorant d'informer par écrit le responsable de l'école doctorale des changements apportés à la présente convention. En cas de changement de directrice ou de directeur de recherche, une nouvelle convention devra être établie.

En cas de modification limitée sur le contenu de cette convention, un avenant peut être proposé par l'établissement qui en a l'initiative.

La convention est résiliée de plein droit en cas d'absence d'inscription de la doctorante ou du doctorant constatée par l'un ou l'autre établissement.

Elle l'est également en cas de renonciation recueillie par l'un des deux établissements. Dans ce cas, la doctorante ou le doctorant est tenu d'en informer ses deux directeurs de recherche et les responsables des écoles doctorales.



## SIGNATURES

En signant la présente convention, les personnes signent qu'elles ont pris connaissance des caractéristiques, conditions et considérations des pages liminaires et qu'elles en acceptent les termes.

UNIVERSITE DE PISE

L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

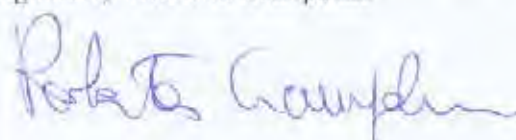
La doctorante ou le doctorant (date et signature) : 19/03/2008 Assunta Bramante

Bramante Assunta

La Directrice ou le Directeur de thèse (date et signature) :  
Professeur Ahmad OULMOUDEN



La Directrice ou le Directeur de thèse (date et signature) : Roberta Ciampolini



Le Responsable de l'Ecole doctorale (date et signature) :

17 JUL. 2008



A.G. MOVAHHEDI

Le Responsable de l'Ecole doctorale (date et signature) :



Le Président de :

(date et signature)





Le Président de l'Université de Pise

(date et signature) :

cf haut de la page

En 6 exemplaires originaux, en langue française et 6 exemplaires originaux in langue italienne un exemplaire dû document signé dans le deux langues devant être retourné à :

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> la doctorante ou le doctorant                                     | <input type="checkbox"/> le Président de l'Université de Pise                                 |
| <input type="checkbox"/> le Président de l'Université de Limoges                           | <input type="checkbox"/> la Directrice ou le Directeur de thèse de l'établissement partenaire |
| <input type="checkbox"/> la Directrice ou le Directeur de thèse de l'Université de Limoges | <input type="checkbox"/> autre (à préciser) :   |

Modèle de convention approuvé par le Conseil Scientifique du 14 mars 2005 et le Conseil d'Administration du 25 mars 2005.

① Pour tout renseignement complémentaire, vous pouvez contacter la Division de la Gestion des Etudiants et des Enseignements :

☎ 05 55 14 91 35 ou ✉ [scolarite@unilim.fr](mailto:scolarite@unilim.fr)



FORMULAIRE D'ENREGISTREMENT  
DE THÈSE SOUTENUE

À FOURNIR OBLIGATOIREMENT EN 2 EXEMPLAIRES POUR TOUTE SOUTENANCE DE  
THÈSE REMISE SOUS FORME PAPIER, QUE CETTE THÈSE SOIT OU NON REPRODUITE (\*)

ÉTABLISSEMENT Università degli Studi di Pisa - Facoltà di Medicina Veterinaria  
ECOLE DOCTORALE Produzioni Animali, Sanità e Igiene degli Alimenti nei Paesi a Clima Mediterraneo

À REMPLIR EN MAJUSCULES PAR L'ÉTUDIANT

1. AUTEUR \*

NOM DE NAISSANCE BRAMANTE

PRÉNOM(S) ASSUNTA

NOM D'USAGE

NOM FIGURANT SUR LA PUBLICATION, si différent des deux précédents

DATE DE NAISSANCE (Format JJMMAAAA) 03/01/1982

2. ADRESSE

N° et RUE 31, VIA MARTIRI LUNATESI

CODE POSTAL 55012

PAYS LUNATA – CAPANNORI

VILLE LUCCA

ADRESSE ÉLECTRONIQUE (facultatif) ASSUNTABRAMANTE@GMAIL.COM

3. DATE DE SOUTENANCE 27 ANNÉE (AAAA) 2011 MOIS (MM) 05

4. DIRECTEUR DE THÈSE

SPÉCIALITÉ RESEARCHER AGR17

NOM CIAMPOLINI

PRÉNOM(S) ROBERTA

5. TYPE DE DOCTORAT : COCHER LE TYPE DE DOCTORAT

☒ THÈSE DOCTORAT

☐ THÈSE D'EXERCICE

☐ THÈSE DOCTORAT D'ÉTAT

DISCIPLINE

6. INDICATIONS BIBLIOGRAPHIQUES :

Nombre de volumes : Nombre total de pages : 140 Nombre de références bibliographiques : 179

AUCUN TEXTE MANUSCRIT N'EST ADMIS. DACTYLOGRAPHIER OU COLLER LE TEXTE IMPRIMÉ DANS LES ZONES PRÉVUES.

TITRE DE LA THÈSE EN FRANÇAIS : Transcrire en toutes lettres les symboles spéciaux.

TRAÇABILITE RACIALE DES VIANDES OVINE A L'AIDE DES OUTILS DE GENETIQUE MOLECULAIRE

(\*) Les informations demandées sur ce formulaire sont destinées, à l'exception de l'adresse, à la constitution du catalogue collectif du Sudoc. Le Sudoc a fait l'objet d'une déclaration à la CNIL (arrêté du 10 septembre 1991 : publié au Journal Officiel du 1<sup>er</sup> octobre 1991).

Le droit d'accès et de rectification prévu par la loi n° 78 – 17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés ne concerne que les informations de la première page de ce formulaire. Il peut s'exercer auprès de : Agence bibliographique de l'enseignement supérieur – BP 84308 / 34193 MONTPELLIER CEDEX 5 [www.abes.fr](http://www.abes.fr).



## RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

Chaque cadre doit contenir un résumé de 1700 caractères maximum, espaces compris. En cas de dépassement, la coupure sera automatique.

Le doctorant adresse son texte sous forme électronique selon les recommandations de la bibliothèque

EN RAISON DE LA CONTAMINATION DES ALIMENTS, LA PRÉOCCUPATION DES CONSOMMATEURS SUR LA SALUBRITÉ DE LES PRODUITS DE VIANDE A AUGMENTÉ. LA TRAÇABILITÉ DE LA VIANDE EST DEVENUE IMPORTANTE, AFIN D'ASSURER LA SECURITE ALIMENTAIRE ET LA VÉRACITÉ D'INFORMATIONS. CETTE RECHERCHE CONTRIBUE À LA PROTECTION DE LA VIANDE DES MOUTONS ITALIEN À TRAVERS UN SYSTÈME DE CERTIFICATION ET DE SUPERVISION AVEC L'AIDE DES MÉTHODES GÉNOMIQUES POUR LA TRAÇABILITÉ DE RACE, CAPABLE DE GARANTIR L'ORIGINE DE LA VIANDE ET POUR IDENTIFIER EXCLUSIF ALLÈLES, GÉNOTYPES ET HAPLOTYPES DE TOUT LES TYPES GÉNÉTIQUES. 700 ÉCHANTILLONS D'ADN GÉNOMIQUE EXTRAIT DU SANG DES PRINCIPALES RACES POUR LA PRODUCTION DE LA VIANDE DANS LE MARCHÉ ITALIEN (ALTAMURANA, BAGNOLESE, LATICAUDA, COMISANA, SARDA, GENTILE DI PUGLIA ET LECCESE) ONT ÉTÉ ANALYSÉES POUR ÉTUDIER LE POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE PAR ANALYSE DE UN PANEL DE 19 MARQUEURS STR. UN SYSTÈME DE TRAÇABILITÉ DE VIANDE A ÉTÉ RÉALISÉ AVEC LE TYPAGE DES MARQUEURS GÉNÉTIQUES DANS LES TISSUS DE VIANDE PRISES À DIFFÉRENTS NIVEAUX DE PRODUCTION ET DISTRIBUTION. AVEC CETTE MÉTHODE, ON OBTIENT LA PROBABILITÉ QU'UN ÉCHANTILLON A D'APPARTENANCE À SA RACE PLUTÔT QU'UN AUTRE. LE METHODE DÉTERMINISTE EST BASÉ SUR LA RECHERCHE DE MUTATIONS PRIVÉE SPÉCIFIQUE D'UNE RACE. GÉNOTYPAGE PAR SÉQUENÇAGE DU LOCI DE COULEUR DE LA ROBE (AGOUTI, MC1R, TYR, TYRP1, TYRP2 ET ARGENT) DANS CES RACES DE MOUTONS A ÉTÉ EFFECTUÉE AFIN DE TROUVER PRIVÉ ALLELES SIGNIFICATIVEMENT ASSOCIÉS À LA COULEUR DE LA ROBE, MUTATIONS INTÉRESSANTS ONT ÉTÉ OBSERVÉS, QUE POURRAIT PRÉSENTER UN INTÉRÊT EN TERMES DE TRAÇABILITÉ DE RACE, MÊME SI CETTE SECONDE MÉTHODE EST ENCORE LOIN D'ÊTRE UTILISÉES SUR LE MARCHÉ.

## RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS

BECAUSE OF THE ALARMING INCIDENTS OF FOOD CONTAMINATION, THE CONCERN OF CONSUMERS ABOUT MEAT SAFETY AND INFORMATION ABOUT MEAT PRODUCTS HAS BEEN INCREASING. MEAT TRACEABILITY HAS BECOME IMPORTANT, IN ORDER TO ENSURE FOOD SECURITY AND INFORMATION VERACITY. THIS RESEARCH CONTRIBUTES TO THE PROTECTION OF ITALIAN SHEEP MEAT THROUGH A SYSTEM OF CERTIFICATION AND PRODUCTS MONITORING BY USING GENOMIC METHODS FOR BREED TRACEABILITY, ABLE OF GUARANTEEING THE ORIGIN OF MEAT AND ABLE TO IDENTIFY PRIVATE OR EXCLUSIVE ALLELES, GENOTYPES AND HAPLOTYPES OF ANY GENETIC TYPES. 700 SAMPLES OF GENOMIC DNA EXTRACTED FROM BLOOD OF THE MAJOR BREEDS USED FOR MEAT PRODUCTION IN THE ITALIAN MARKET (ALTAMURANA, BAGNOLESE, LATICAUDA, COMISANA, SARDA, GENTILE DI PUGLIA AND LECCESE) WERE ANALYZED WITH THE AIM TO STUDY THE GENETIC POLYMORPHISM BY ANALYSIS OF A PANEL OF 19 STR MARKERS. A SYSTEM OF MEAT TRACEABILITY WAS REALIZED USING THE GENETIC MARKERS TYPING IN TISSUES OF MEAT TAKEN AT DIFFERENT LEVELS OF PRODUCTION AND DISTRIBUTION. WITH THIS PROBABILISTIC METHOD WE OBTAIN AS RESULT THE LIKELIHOOD THAT A SAMPLE HAS OF BELONGING TO ITS EFFECTIVE BREED RATHER THAN ANOTHER. DETERMINISTIC METHOD IS FREE FROM STATISTICAL INFERENCE AND IT IS BASED ON RESEARCHING OF PRIVATE MUTATIONS SPECIFIC OF A BREED. GENOTYPING BY SEQUENCING OF THE COAT COLOR LOCI (AGOUTI, MC1R, TYR, TYRP1, TYRP2 AND SILVER) IN THESE SHEEP BREEDS WAS PERFORMED IN ORDER TO FIND ANY PRIVATE ALLELES SIGNIFICANTLY ASSOCIATED WITH COAT COLOR. INTERESTING MUTATIONS WERE OBSERVED, POTENTIALLY OF INTEREST IN TERMS OF BREED TRACEABILITY, EVEN THOUGH THIS SECOND METHOD IS STILL FAR FROM BEING USED ON THE MARKET.

**TITRE DE LA THÈSE EN ANGLAIS :** Transcrire en toutes lettres les symboles spéciaux

THE BREED TRACEABILITY OF SHEEP MEAT BY USING MOLECULAR GENETICS  
METHODS

**PROPOSITION DE MOTS-CLÉS :**

- 1 BREED TRACEABILITY
- 2 INDIVIDUAL TRACEABILITY
- 3 LIKELIHOOD
- 4 SHEEP

- 5 MEAT
- 6 COAT COLOR GENES
- 7 PROBABILISTIC APPROACH
- 8 DETERMINISTIC APPROACH

**AUTORISATIONS :**

- ☐ OUI, la thèse est diffusable dans le respect des droits à l'image, droits d'auteurs et droits voisin :
- ☐ En texte intégral
  - ☐ Après retrait des œuvres ou extraits significatifs d'œuvres protégées et signalées comme telles dans la thèse
- ☐ NON : préciser obligatoirement
- ☐ Je n'autorise pas la diffusion de ma thèse sur Internet après sa numérisation
  - ☐ Je n'autorise pas la reproduction de ma thèse aux frais de l'Etat sous forme de microfiches

**DATE ET SIGNATURE DE L'AUTEUR**

13/04/2014  
Bramante Assunta

---

**À REMPLIR PAR LE SERVICE DE DOCTORAT**

**ÉTABLISSEMENT**

**CONFIDENTIALITÉ PRONONCÉE PAR LE PRÉSIDENT DE L'ÉTABLISSEMENT**

- ☐ NON
- ☐ OUI : thèse confidentielle JUSQU'EN (préciser obligatoirement)

**CORRECTIONS : une possibilité uniquement**

- ☐ Pas de correction demandée
- ☐ Thèse corrigée dans le délai de 3 mois après la soutenance
- ☐ Thèse non corrigée dans le délai de 3 mois après la soutenance

APRÈS VÉRIFICATION, DATE et CACHET DU SERVICE DE DOCTORAT



## À REMPLIR PAR LA BIBLIOTHÈQUE

### CATALOGAGE DE LA THÈSE ASSURÉ PAR LA BIBLIOTHEQUE DE L'ÉTABLISSEMENT

#### LOCALISATION DE L'EXEMPLAIRE ORIGINAL :

RCR

#### NUMÉRO D'IDENTIFICATION DE LA THESE

Composé de 12 caractères : les 4 premiers indiquent l'année de soutenance, les 4 suivants l'établissement, les 4 derniers correspondent à un numéro séquentiel

---

DISCIPLINE (telle qu'elle est indiquée sur la page de titre de la thèse.)

#### INDEXATION RAMEAU

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

#### INDEXATION LIBRE

- 1
- 2
- 3
- 4

---

#### REPRODUCTION

☐

NON

☐

OUI : Thèse reproductible sous forme de microfiches. Transmission d'un exemplaire accompagné du formulaire à l'Atelier national de reproduction de

☐

Lille

☐

Grenoble

☐

OUI : Thèse diffusable sur Internet

☐

En texte intégral

☐

Après retrait des œuvres ou extraits significatifs d'œuvres protégées et signalées comme telles dans la thèse

DATE ET CACHET DE L'ÉTABLISSEMENT

Etablissement de soutenance : Université de Limoges

Ecole Doctorale Thématique :

- ☐ Sciences et Ingénierie pour l'Information (ED n°521)  
☐ Sciences et Ingénierie en Matériaux, Mécanique, Energie et Aéronautique (ED n°522)  
☐ Sciences pour l'Environnement (ED n°523)  
☒ Biologie, Santé (ED n°524)  
☐ Droit et Science Politique (ED n°88)  
☐ Lettres, pensées, Arts et Histoire (ED n°525)  
☐ Sociétés et Organisations (ED n°526)  
☐ Cognition, Comportement, Langage(s) (ED n°527)

Composante :

- ☐ Faculté des lettres et sciences humaines  
☐ Faculté de droit et sciences économiques  
☐ Faculté de médecine  
☒ Faculté des sciences et techniques  
☐ Institut d'Administration des Entreprises  
☐ Faculté de pharmacie

Institut de recherche : ☐ XLIM ☐ IPAM ☐ GEIST ☐ SHSEquipe de recherche (laboratoire, département...) : *Unité de Génétique Moléculaire (Animale) UMR 1061 - INRA*

## RENSEIGNEMENTS SUR L'AUTEUR

NOM patronymique : BRAHANTE  
NOM marital :

Prénom : ASSUNTA

Né(e) le (JJ/MM/AAAA) : 03/01/1982

Nationalité : ITALIANA

Adresse électronique : ASSUNTABRAHANTE@GMAIL.COM

Adresse postale : VIA MARTIRI LUNATESI N° 31, 55012, LUNATA - CAPANNORI, LUCCA  
Téléphone : +39 328 4655833 - +39 050 2216875

## RENSEIGNEMENTS SUR LA THESE

Titre de la thèse : LA TRACCIABILITA' di RAZZA della CARNE OVINA con METODOLOGIE di  
GENETICA MOLECOLARE

Directeur de la thèse : DR. ROBERTA CIAMPOLINI

Date de soutenance (JJ/MM/AAAA) : 27/05/2011

## DEPOT DE LA THESE

- Date du dépôt de la version imprimée (JJ/MM/AAAA) :
- Date du dépôt de la version électronique (JJ/MM/AAAA) :
- Formats, programmes et logiciels utilisés :

L'auteur certifie la conformité de la version électronique à l'exemplaire imprimé déposé conjointement.

Signature :



- Vu l'avis du Conseil scientifique du : 16 septembre 2002;
- Vu l'avis du Conseil d'Administration du : 20 septembre 2002 autorisant la Charte de diffusion électronique des thèses.



### AVIS DU JURY SUR LA PUBLICATION DE LA THESE

- ☐ Thèse pouvant être publiée en l'état  
☐ Thèse pouvant être publiée après corrections demandées au cours de la soutenance  
☐ Thèse confidentielle

Jusqu'en (JJ/MM/AAAA) :

Président du jury :

Signature :

### VALIDATION PAR L'ETABLISSEMENT

Date (JJ/MM/AAAA) :

Numéro d'identification de la thèse :

Cachet :

### AUTORISATION DE DIFFUSION DE L'AUTEUR

L'auteur reconnaît avoir pris connaissance de la Charte de diffusion électronique des thèses de  
l'Université de Limoges ☒ OUI ☐ NON

L'auteur autorise la diffusion, dans le respect de la Charte et sous la responsabilité de  
l'établissement de soutenance :

de la thèse en texte intégral sur le réseau Internet ☒ OUI ☐ NON

de substituts papier de la thèse ☒ OUI ☐ NON

Date de l'autorisation de mise en ligne (JJ/MM/AAAA) :

Signature obligatoire :

*Bramante Asunta*

Cochez les cases correspondantes



## Suivi des docteurs de l'Université de Limoges

Date de la soutenance :

27 / 05 / 2011

Vous allez prochainement obtenir le titre de docteur de l'Université de Limoges et je tiens à vous féliciter pour vos travaux.

Pour nous permettre de vous contacter ultérieurement pour connaître votre situation professionnelle post-doctorale, merci de nous transmettre vos coordonnées.

Nom BRAMANTE

Prénom ASSUNTA

Adresse permanente (adresse des parents le cas échéant) VIA MARTIRI  
LUNATESI N° 31, 55012 LUNATA - CAPANNORI, LUCCA

Code postal /5/5/0/1/2/

Ville LUCCA

Courriel personnel : ASSUNTA BRAMANTE @ GMAIL.COM

Courriel professionnel : \_\_\_\_\_ @ \_\_\_\_\_

Alexandre MAITRE

Directeur du Collège Doctoral de Site